ZUR METHODIK DER BINDUNGSANALYSEN VON DIETHYLSTILBÖSTROL UND DIETHYLSTILBÖSTROLANALOGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HELMUT GLAUBITZ
aus

WEISSENBURG

BONN 1980

ZUR METHODIK DER BINDUNGSANALYSEN VON DIETHYLSTILBÖSTROL UND DIETHYLSTILBÖSTROLANALOGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HELMUT GLAUBITZ
aus

WEISSENBURG

BONN 1980

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	4
2.	DER HORMON-REZEPTOR-KOMPLEX	6
3.	DER ÖSTRADIOL-REZEPTOR-KOMPLEX	9
4.	DIE GESETZMÄSSIGKEIT DES HORMON-REZEPTOR-KOMPLEXES	13
5.	DIE "PROPORTION GRAPH METHOD"	18
6.	DIE DURCHFÜHRUNG DER BINDUNGSANALYSE	24
6.1.	Die Dextran-Kohle-Adsorptionsmethode	25
6.2.	Die Ausgleichsdialyse	26
7.	UNTERSUCHUNGEN MIT DEM SCHOLTAN'SCHEN DIALYSE-GERÄT	29
7.1.	Versuche zur Verminderung der Adsorption von C14-EST	32
7.2.	Änderung der Pufferzusammensetzung	32
7.2.1.	Änderung des Membranmaterials	34
7.2.2.	Änderung des Kammermaterials	35
7.2.3.	Änderung der Dichtungen	35
8.	KONSTRUKTION DER NEUEN KAMMERN	37
8.1.	Dialyse mit den neuen Kammern	38
8.2.	Bestimmung der Bindungskonstanten von Östradiol mit Rinderalbumin in den neuen Kammern	41

UNIV. LEIDEN BIBL.

Seite

8.2.1.	Durchführung der Bindungsversuche	42
8.2.2.	Berechnung der Bindungskonstanten	43
9.	BESTIMMUNG DER BINDUNGSKONSTANTEN MIT DER ADSORPTIONSMETHODE	47
10.	DURCHFÜHRUNG DER BINDUNGSANALYSE MIT DER ADSORPTIONSMETHODE	48
11.	DIE GEWINNUNG DES REZEPTORS	52
11.1.	Bestimmung der Bindungskonstanten mit der Adsorptionsmethode	55
11.2.	Berechnung der Bindungskonstanten	58
12.	BESTIMMUNG DER BINDUNGSKONSTANTEN MIT DER DIALYSEMETHODE	68
13.	VERDRÄNGUNGSANALYSE MIT DIETHYLSTILBÖSTROLANALOGEN	73
14.	VERGLEICHENDE BERECHNUNGEN DER BINDUNGSKONSTANTEN	87
15.	ZUSAMMENFASSUNG	97
16.	EXPERIMENTELLER TEIL	98
16.1.	Allgemeine Methoden	98
16.2.	Radioaktiv markierte Hilfsstoffe, Puffer, Reagenzien, Membranen	98
16.3.	Vergleichssubstanzen	101
16.4.	Meßergebnisse und deren Berechnungen	102
16.5.	Rechenprogramme	147
17.	LITERATURVERZEICHNIS	153

1. Einleitung und Problemstellung

Das wichtigste Merkmal aller Hormone ist ihre Fähigkeit, biologische Vorgänge zu steuern. Dabei wirken die Hormone durch die Weitergabe von Informationen, die dann zur Auslösung der zellspezifischen Aktivität führen [1].

Diese Aufgabe können die Hormone allerdings nur deshalb erfüllen, weil sie von ihren jeweiligen Erfolgsorganen erkannt und aufgenommen werden. Hierfür sind spezifische Hormon-Rezeptoren verantwortlich, deren Existenz und deren Bedeutung für die Wirkungsweise der Hormone schon früh postuliert worden ist [2].

Aber erst in den sechziger Jahren gelang es *Jensen* [3] zum ersten Mal einen Östradiol-Rezeptor-Komplex zu charakterisieren. Daraufhin konnten in den folgenden Jahren in zahlreichen Untersuchungen [4-7] auch für die anderen Hormongruppen die jeweiligen spezifischen Rezeptoren nachgewiesen werden.

Allen diesen Hormon-Rezeptoren ist gemeinsam, daß sie mit einer sehr hohen Strukturspezifität reagieren können. Sie sind in der Lage, selbst geringe Veränderungen in chemischen Strukturen zu unterscheiden.

In den zahlreichen Arbeiten, in denen auch eine Reihe von unterschiedlichen Untersuchungs- und Auswertungsmethoden zur Bestimmung von Hormon-Rezeptor-Komplexen entwickelt wurden, sind die Bindungsversuche mit Östradiol (Abb.1) und Östradiolderivaten am Östradiol-Rezeptor durchgeführt worden. Dabei wurden die für die spezifische Bindung notwendigen Substituenten am Östradiol aufgezeigt [8].

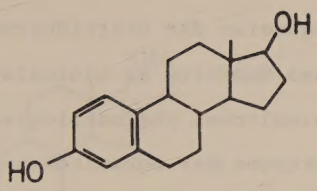


Abb.1. Östradiol

Aufbauend auf diese Ergebnisse soll in der vorliegenden Arbeit zunächst nach einer geeigneten Auswertungs- und Bestimmungsmethode gesucht werden. Anschließend sind anhand dieser Methoden die Rezeptorbindungen der Diethylstilböstrolanalogen zu bestimmen.

2. Der Hormon-Rezeptor-Komplex

Betrachtet man die Wirkungsweise der Steroidhormone, so ist ein breites und differenziertes Spektrum an biologischen Effekten zu verzeichnen. Die unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungen werden durch geringe Änderungen der Substituenten bzw. durch Variation der Stereochemie am Grundgerüst, welches allen diesen Hormonen gemeinsam ist (Abb.2), hervorgerufen.

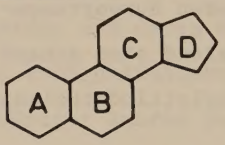


Abb.2. Cyclopentanonperhydrophenanthren

Als Beispiele sollen hier das männliche Sexualhormon Testosteron sowie die weiblichen Sexualhormone Progesteron und Östradiol dienen (Abb.3).

Vergleicht man Testosteron mit Progesteron, so lassen sich lediglich am C-17 Unterschiede feststellen: an dieser Stelle hat Testosteron eine OH-Gruppe, während Progesteron dort eine $CH_3C{=}O$-Gruppe besitzt. Durch Umlagerung in die Enolform und Abspaltung der CH_3-Gruppe aus Position 10 zusammen mit einem Proton aus Position 1 - vergleichbar mit einer Dehydrierung - wird, rein formal betrachtet, aus Testosteron unter Aromatisierung des Ringes A das Östradiol.

Diese Unterschiede in der chemischen Struktur reichen aus für die grundverschiedenen pharmakologischen Wirkungen: Testosteron bewirkt die Ausbildung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale; Progesteron, ein Gestagen, und Östradiol, ein Östrogen, haben nebeneinander verschiedene Einflüsse auf den weiblichen Sexualcy-

clus und die Schwangerschaft.

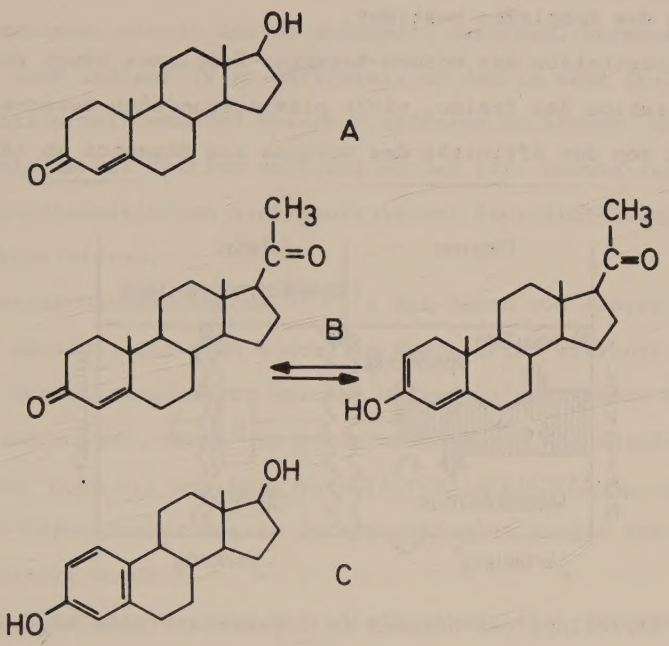


Abb.3. Testosteron (A), Progesteron (B), Östradiol (C)

Für diese unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungen, die durch die Veränderungen an den Molekeln zustande kommen, sind die R e z e p t o r e n, die sich in den Erfolgsorganen (target cells) befinden, verantwortlich [9-11]. Diese Rezeptoren können die Hormone mit einer äußerst hohen Strukturspezifität binden und in den Zellen der Erfolgsorgane anreichern. Sie sind sowohl für die Erkennung als auch die Aufnahme der Hormone in die Zellen des Zielgewebes zuständig. Ein entscheidender Schritt des Erkennungsvorgangs und der Wirkung ist die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor. Dabei wird die biologische Aktivität eines Hormons durch

die Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes am Wirkort und durch die als "intrinsic activity" [12,13] bezeichnete spezifische Wirkung des Komplexes bestimmt.

Die Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes hängt von der Konzentration des freien, nicht plasmagebundenen Hormons am Wirkort und von der Affinität des Hormons zum Rezeptor ab (Abb.4).

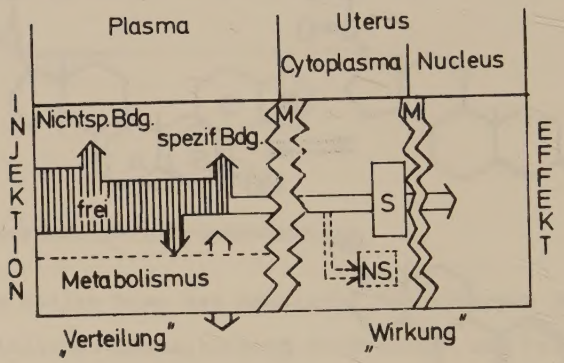


Abb.4. Verteilung des Hormons im Organismus (nach *Raynaud* [8])

3. Der Östradiol-Rezeptor-Komplex

Zum ersten Mal gelang es *Jensen* [3], einen Hormon-Rezeptor-Komplex nachzuweisen. Hierzu war es notwendig geworden, Hormone ausreichend hoch radioaktiv zu markieren, um den in sehr geringer Konzentration vorkommenden Rezeptor erfassen zu können. Mit Östradiol, welches mit Tritium markiert worden ist, konnte *Jensen* dann den cytoplasmatischen (intrazellulären) Östradiol-Rezeptor-Komplex charakterisieren.

Zahlreiche Untersuchungen [14-17], die denen von *Jensen* folgten, haben gezeigt, daß sich sowohl im Endometrium als auch im Myometrium des Uterusgewebes, welches Östradiol spezifisch binden und anreichern kann, neben dem cytoplasmatischen Östradiol-Rezeptor-Komplex noch ein weiterer Östradiol-Rezeptor-Komplex nachweisen läßt. Dieser zweite Rezeptor-Komplex konnte aus dem Nucleus isoliert werden.

In Abb.5 ist der Weg des Östradiols schematisch dargestellt. Das Hormon wird zuerst an den Cytosol-Rezeptor gebunden. Dieser Rezeptor ist für die Erkennung und die Aufnahme von Östradiol verantwortlich. Nach erfolgter Bindung wandert dieser Östradiol-Rezeptor-Komplex in den Zellkern. Dort bildet sich ein neuer Östradiol-Rezeptor-Komplex, der für die Speicherung des Hormons und die Wirkung verantwortlich ist [18].

Während der Hormon-Rezeptor-Komplex im Cytoplasma ständig abnimmt, steigt die Konzentration des Komplexes im Zellkern ständig an.

Allerdings können die Rezeptor-Komplexe im Zellkern nicht festgestellt werden, sobald das Hormon fehlt [19,20].

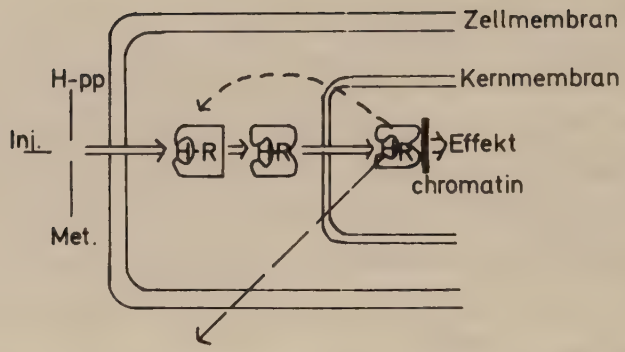


Abb.5. Der Weg des Hormons in der Gewebszelle (nach *Baulieu* [18])

Der Östradiol-Rezeptor reagiert mit einer hohen Strukturspezifität. Bereits durch geringe Veränderungen an der Struktur von Östradiol nimmt die Affinität zum Rezeptor stark ab [21-24]. So führt z.B. eine Blockierung der OH-Gruppen zu einem starken Bindungsverlust. Ebenfalls hat eine Änderung der Stellung der OH-Gruppe am C-17 von der β- in die α-Position eine Verminderung der Bindungskraft von ca. 70% zur Folge [25].

Um so erstaunlicher ist es, daß Diethylstilböstrol, ein Stilbenderivat (Abb.6), ebenfalls einen Komplex mit dem Östradiol-Rezeptor bilden kann und vergleichbare pharmakologische Wirkung zeigt.

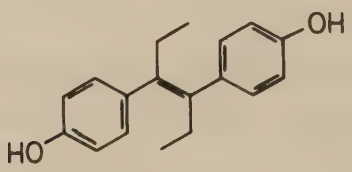


Abb.6. Diethylstilböstrol

Für die Bindung von Diethylstilböstrol an den Rezeptor sind die beiden OH-Gruppen ebenfalls essentiell [26]. Zudem haben die bei-

den Ethylgruppen einen Einfluß auf die Bildung des Rezeptor-Komplexes, da die Affinität zum Rezeptor von Diethylstilböstrol über Dimethylstilböstrol nach Stilböstrol immer schwächer wird. Dies könnte die Vermutung zulassen, daß DES befähigt ist, ein Quasisterangerüst zu simulieren (Abb.7,8), wodurch eine große Ähnlichkeit zum Östradiol entstehen würde. Damit könnte die hohe Bindungsaffinität des DES zum Rezeptor erklärbar sein.

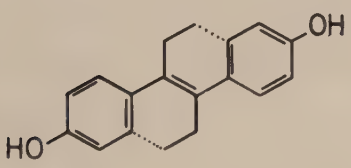


Abb.7. Pseudosterangerüst des Diethylstilböstrols

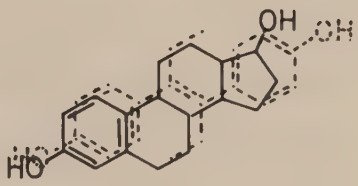


Abb.8. Östradiol ———, Diethylstilböstrol ----

Betrachtet man allerdings die "superposition" nach *Hospital*[27,28] beider Verbindungen (Abb.9), so erkennt man, daß die beiden Moleküle in ihrer räumlichen Struktur nicht völlig übereinstimmen.

Abb.9. "superposition" von Östradiol ——— und Diethylstilböstrol ---- (nach *Baulieu* [18])

Hier stellt sich die Frage, warum der Östradiol-Rezeptor zum einen äußerst empfindlich auf Veränderungen der Substituenten am Molekül von Östradiol reagieren kann, zum anderen aber auf relativ große Abweichungen im Grundgerüst keine merkliche Reaktion

im Bindungsverhalten und der damit ausgelösten Wirkung zeigt.

Dieses könnte die Vermutung aufdrängen, daß eine Substanz für eine spezifische Bindung an den Östradiol-Rezeptor die beiden OH-Gruppen, evtl. im definierten Abstand, aufweisen muß, wobei Unterschiede im Grundgerüst der einzelnen Verbindungen eine geringe Rolle spielen.
Um diese Frage beantworten zu können, soll im folgenden, nachdem eine geeignete Auswertungs- und Untersuchungsmethode festgelegt worden ist, versucht werden, das Grundgerüst von DES systematisch aufzubauen. Danach soll anhand der Bindungsstudien mit dem Östradiol-Rezeptor festgestellt werden, ob noch weitere Abhängigkeiten zwischen der chemischen Struktur einer Verbindung und der Affinität zum Östradiol-Rezeptor bestehen.

4. Die Gesetzmässigkeit des Hormon-Rezeptor-Komplexes

Aufgrund bisheriger Untersuchungen über die Bindungsfähigkeit von Arzneistoffen an Rezeptoren kann es als sicher gelten, daß es sich dabei um eine Reaktion handelt, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht [29-31].

$$[H] + [R] \rightleftharpoons [H - R]$$

[H] = molare Konzentration an Hormon
[R] = molare Konzentration an Rezeptor
[H-R] = molare Konzentration an Hormon-Rezeptor-Komplex

Für den Fall, daß das Hormon in radioaktiv markierter Form vorliegt, kann die Bindung an den Rezeptor direkt gemessen werden. Die Auswertung der Komplexbildung von Hormon und Rezeptor erfolgt dann über eine graphische Darstellung, die zu einer Geraden führen muß. Aus der Steigung und den Schnittpunkten der Geraden mit x- und y-Achse können die Bindungsparameter berechnet werden.

Zur Darstellung einer solchen linearen Beziehung der Komplexbildung zwischen Hormon und Rezeptor kann die von *Scatchard* [32] angegeben werden. Diese Gleichung soll im folgenden abgeleitet und graphisch dargestellt werden (Abb.10):
Aus der oben genannten Beziehung

$$[H] + [R] \rightleftharpoons [H - R] \qquad (1)$$

gilt:

$$K = \frac{[H - R]}{[H] \cdot [R]}$$

Setzt man:

$$[R] = [R_0] - [H - R]$$

so folgt:

$$K = \frac{[H - R]}{[H] \cdot ([R_0] - [H - R])}$$

oder:

$$\frac{[H - R]}{[H]} = K\ ([R_0] - [H - R])$$

$$\frac{[H - R]}{[H] \cdot [R_0]} = K\ \frac{[R_0] - [H - R]}{[R_0]}$$

$$\frac{[H - R]}{[H] \cdot [R_0]} = K\ (1 - \frac{[H - R]}{[R_0]})$$

Abb.10. [H-R]/[H] = f ([H-R]); Darstellung nach *Scatchard* [32]

In der Praxis ist die Konzentration [R] der freien Rezeptoren

sehr schwer bzw. überhaupt nicht bestimmbar. Dafür setzt man die Konzentration des gesamten Rezeptors [R_0] ein. Diese Konzentration [R_0] wird als proportional zur meßbaren Protein-Konzentration angenommen. Die Protein-Konzentration wird nach der Methode von *Lowry* [33] bestimmt.

In Abbildung 10 kann aus der Steigung der Geraden die Affinitätskonstante K_A abgeleitet werden. Bildet man den Kehrwert von K_A, so erhält man die Dissoziationskonstante K_D. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse berechnet sich n, welches ein Maß für die Zahl der Bindungsstellen darstellt. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ergibt k-n. k läßt sich aus der Beziehung

$$K = n \cdot k$$

berechnen [34].

Damit auf die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes das Massenwirkungsgesetz angewendet werden kann, muß bei der Bestimmung der Bindungskonstanten unterhalb des Sättigungsbereiches des Rezeptors gearbeitet werden. Die Konzentration des Rezeptors in einer Präparation liegt in der Größenordnung von 10^{-8} mol/l. Daher müssen zur Bestimmung der Bindungskonstanten von derartig niedrigen Konzentrationen an Bindungspartnern Hormone mit hoher spezifischer Aktivität eingesetzt werden (>10 Ci/mmol). Alle herkömmlichen spektrometrischen Verfahren zur Bestimmung der niedrigen Hormonkonzentrationen versagen bei diesen großen Verdünnungen.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wird der Rezeptor und das jeweilige Hormon in einer Pufferlösung mit dem pH-Wert von 7.4 zusammengegeben. Nach der Einstellung des Gleichgewichtes müssen freies und an den Rezeptor gebundenes Hormon voneinander getrennt

werden (Abb.11).

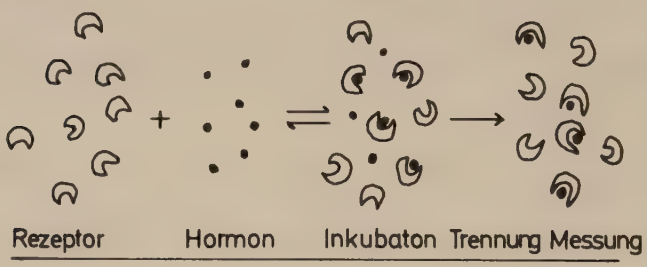


Abb.11. Schematische Darstellung der "direkten" Messung der Rezeptor-Bindung (nach *Lübke* [1])

Aus diesen Größen können dann die einzelnen Daten für die graphische Darstellung nach *Scatchard* [32] berechnet werden. Zur Trennung von freiem und gebundenem Hormon stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung (s.S.25).

Gelegentlich ergibt die graphische Darstellung der *Scatchard*-Gleichung eine durchgebogene Kurve (Abb.12).

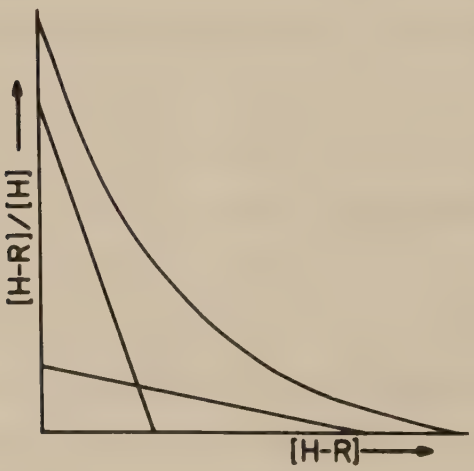


Abb.12. *Scatchard*-Darstellung bei Anwesenheit von zwei Bindungsstellen

Diese Darstellung, die von der üblicherweise erhältlichen Gerade abweicht, kann zwei Ursachen haben:

1. Der Bindungspartner, der Rezeptor, weist mehr als eine Bindungsstelle auf. Derartige Kurven lassen sich dann näherungsweise in zwei oder mehr Geraden zerlegen. Zum Beispiel konnten für Insulin und Prostaglandine auf diese Weise zwei Bindungsstellen nachgewiesen werden [35-38].
2. In der Rezeptorpräparation liegt ein Gemisch von verschiedenen Bindungspartnern mit unterschiedlichen Affinitäten zum Hormon vor.

Mit der Darstellung nach *Scatchard* ist man allerdings nicht in der Lage, zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden.

Für die anstehenden Versuche wird es jedoch von größter Wichtigkeit sein, gerade darin sicher zu gehen, daß nur eine Bindungsstelle und nur ein Bindungspartner vorliegen, mit denen das Hormon im Bindungsversuch einen Komplex bildet, und daß keine weiteren evtl. unspezifisch bindenden Reaktionspartner miterfaßt werden.

Um darüber entscheiden zu können, wird eine zweite Methode zur Auswertung der Bindungsanalysen herangezogen (siehe Kap.5.).

5. DIE "PROPORTION GRAPH METHOD"

Mit dieser Methode [39] ist man tatsächlich in der Lage, zwischen verschiedenen Arten von Bindungspartnern, die in der gleichen Rezeptorpräparation vorliegen können, zu unterscheiden. Mit der Auswertung nach der "proportion graph method" kann man graphisch und rechnerisch folgende verschiedene Möglichkeiten von bindenden Systemen darstellen, selbst wenn diese nebeneinander in der gleichen Rezeptorpräparation vorliegen:

1. ein oder zwei spezifisch bindende Systeme (S oder S_I + S_{II}),
2. ein nicht spezifisch bindendes System (NS),
3. ein spezifisch bindendes und ein nicht spezifisch bindendes System (S + NS),
4. zwei spezifisch bindende Systeme und ein nicht spezifisch bindendes System (S_I + S_{II} + NS).

Für eine Auswertung nach der "proportion graph method" müssen folgende Bedingungen gegeben sein:

1. Die Bindungssysteme müssen unabhängig voneinander sein.
2. Die Bindungsstellen eines jeden Bindungssystems müssen gleich sein.
3. Die Bindung soll dem Massenwirkungsgesetz gehorchen.

Für die Einstellung des Gleichgewichts zwischen

$$[H] + [R] \rightleftharpoons [H - R]$$

gilt dann:

$$[B] = \sum \frac{[N_i] \times [U]}{1/K_i + [U]}$$

[N] = Konzentration der Bindungsstellen = Anzahl der Bindungsstellen pro Mol Protein

[U] = Konzentration an ungebundenem Hormon

[B] = Konzentration an gebundenem Hormon

K = Assoziationskonstante (M^{-1})

Zudem gilt:

$$[T] = [B] + [U]$$

[T] = Konzentration des Hormons nach der Einstellung des Gleichgewichts von [H] + [R] $\rightleftharpoons$ [H-R]

Für den Fall, daß die Bindungsanalyse mit einem spezifisch bindenden System (Protein oder Rezeptor) durchgeführt wird, ergibt sich aus den oben genannten Gleichungen:

$$[B_S] = \frac{[N_S] \times [U]}{1/K_S + [U]}$$

Um die Konstante K_S und die Anzahl der Bindungsstellen N_S berechnen zu können, müssen die Meßwerte aus der Bindungsanalyse graphisch ausgewertet werden. Hierzu trägt man die Größen log b (b= [B]/[T]) und log u (u= [U]/[T]) gegen log [T] auf (Abb.13).

Wenn der Wert von [T], d.h. die Summe der Konzentrationen von gebundenem und ungebundenem Anteil des Hormons steigt, sind alle Bindungsstellen des Systems abgesättigt. Dadurch folgt log b der Funktion log [T] - log $[N_S]$, die die Steigung von -1 in der Graphik (Abb.13) zeigt. Dieses gilt nur für den Fall, daß die Skaleneinteilung von Ordinate und Abszisse gleich sind. Wird nun log b gegen die Abszisse extrapoliert, so erhält man den Wert für log $[N_S]$.

Läßt man [U] gegen 0 streben, so wird log b assymptomatisch zu log $K_S[N_S]/(1+K_S[N_S])$ und log u zu log $1/(1+K_S[N_S])$. Daraus ergibt sich für log b - log u fast der gleiche Wert wie für log $K_S[N_S]$.

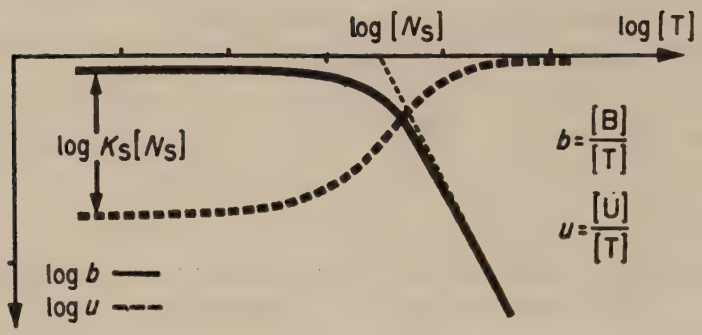


Abb.13. Darstellung eines spezifisch bindenden Systems nach "proportion graph method"

Für den Fall, daß als Bindungspartner für das Hormon nur ein unspezifisch bindendes System (z.B. Albumin) vorliegt, erhält man einen Kurvenverlauf, der sich deutlich von dem eines spezifisch bindenden Systems unterscheidet. Es ergibt sich eine Parallele zur Abszisse (Abb.14). Für diese Gerade gilt:

$$[B_{NS}] = \frac{[N_{NS}] \times [U]}{1/K_{NS} + [U]} = K_{NS}\,[U]\,([N_{NS}] - [B_{NS}])$$

Diese Gerade zeigt deutlich, daß die Bindung in einem System, das einen unspezifischen Bindungspartner enthält, von [T] unabhängig ist; daher kann hierbei keine Sättigung des Bindungspartners durch das Hormon erreicht werden.

Liegen bei den Bindungsversuchen ein spezifisch bindendes System (z.B. ein Rezeptor) und ein nicht spezifisch bindendes System (z.B. Albumin) nebeneinander vor, so überlagern sich die beiden Kurven aus Abb.13 und Abb.14, und es ergibt sich daraus ein neues Kurvenbild (Abb.15).

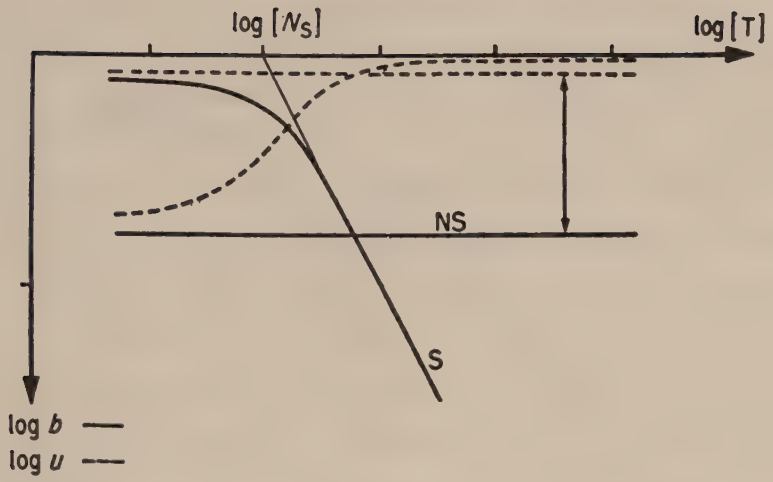


Abb.14. Darstellung eines unspezifisch bindenden Systems nach "proportion graph method"

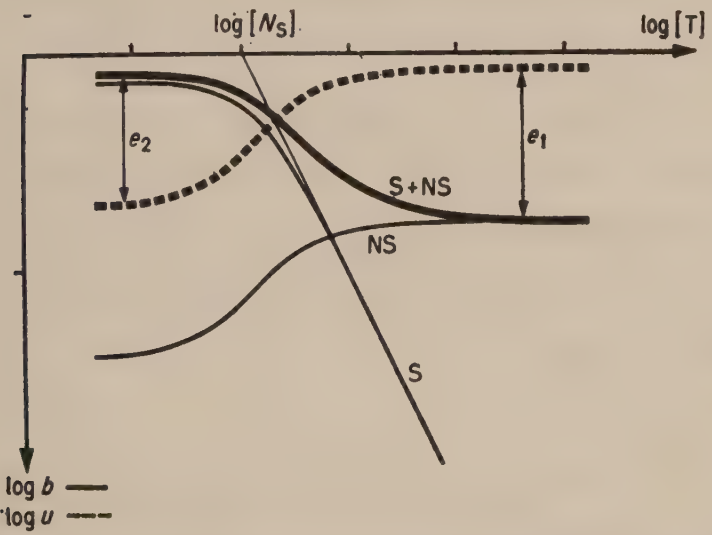


Abb.15. Darstellung eines spezifisch und eines unspezifisch bindenden Systems nach "proportion graph method"

Der Kurververlauf von log b zeigt im ersten Abschnitt, daß log b

von [T] abhängig ist. In diesem Bereich wird das Hormon von dem spezifisch bindenden System gebunden. Allerdings kann keine Sättigung der Bindungsstellen im gesamten System erfolgen. Dieses wird deutlich durch den weiteren Verlauf von log b gezeigt. Die Kurve erreicht nicht die Steigung -1, sondern sie verläuft im zweiten Teil assymptotisch zur Abszisse. In diesem Bereich erfolgt die Bindung des Hormons an den unspezifisch bindenden Anteil des Systems, und log b ist von [T] nicht mehr abhängig.

Als letztes sollen die Kurvenbilder der Systeme, die entweder $S_I + S_{II}$ oder $S_I + S_{II} + NS$ enthalten, gezeigt werden (Abb.16).

Die aufgeführten Kurvenbilder verdeutlichen, daß man mit dieser Darstellung nach der "proportion graph method" schnell feststellen kann, ob bei einer erfolgten Bindungsanalyse ein spezifisch oder ein nicht spezifisch bindendes System bzw. ein Gemisch beider Systeme vorgelegen hat.
Um diese verschiedenen Möglichkeiten bei den folgenden Versuchen unterscheiden zu können, soll die graphische Darstellung der "proportion graph method" verwendet werden. Dabei kann gezeigt werden, daß im System nur der spezifisch bindende Anteil erfaßt worden ist; daher soll die Berechnung der Bindungskonstanten nach *Scatchard* [32] erfolgen.

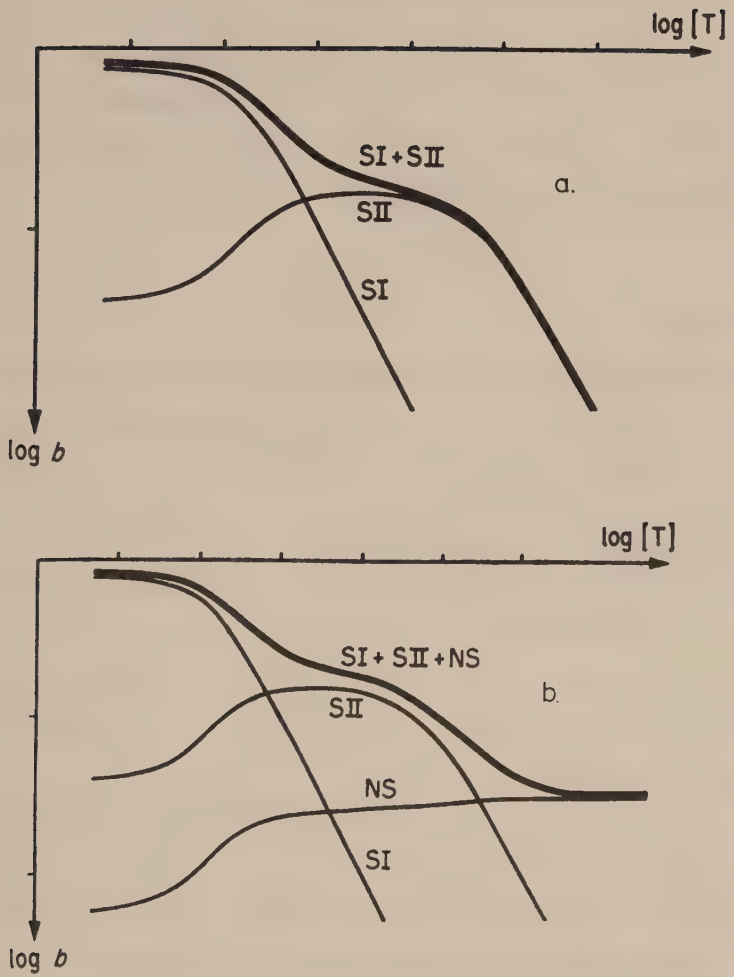


Abb.16. Darstellung nach "proportion graph method":
a) zwei spezifisch bindende Systeme,
b) zwei spezifisch und ein unspezifisch bindendes System

6. Die Durchführung der Bindungsanalyse

Die Bindungsanalyse von Hormonen und dem Hormonrezeptor muß unter den Bedingungen durchgeführt werden, die gewährleisten, daß der Bindungspartner (Rezeptor) während des gesamten Versuchs stabil bleibt und daß die Einstellung des Gleichgewichts

$$[H] + [R] \rightleftharpoons [H - R] \qquad (1)$$

erfolgen kann.

Für eine ausreichende Stabilität des Bindungspartners (Rezeptors) sorgt eine Temperatur von 0-4°C, bei der die Bindungsanalysen durchgeführt werden. Eine zusätzliche Sicherheit bietet ein Sterilisieren sämtlicher Arbeitsgeräte.

Für die Einstellung des Gleichgewichts

$$[H] + [R] \rightleftharpoons [H - R]$$

genügen im allgemeinen kurze Zeiten, in denen das Hormon mit dem Rezeptor reagieren muß. Hierbei sind bereits einige Stunden (ca. 6 Stunden) ausreichend.

Große Probleme bringt allerdings die optimale Trennung von freiem und gebundenem Hormon mit sich, die notwendig ist, um die für die Berechnung der Bindungskonstanten notwendigen Größen des gebundenen und freien Anteils des Hormons bestimmen zu können.

Zum einen besteht die Forderung, daß dabei das einmal eingestellte Gleichgewicht nicht mehr zerstört wird; zum anderen soll der Trennvorgang rationell durchgeführt werden können.

In der Literatur sind zahlreiche Verfahren beschrieben, die auf den verschiedensten Trennprinzipien beruhen [40-42].

Alle diese verschiedenen Versuchstypen können in zwei Gruppen eingeteilt werden (Tab.1).

Tab.1. Methoden zur Bestimmung der Bindungskonstanten:
A= Bindungsgleichgewicht wird durch die Trennung gestört;
B= Bindungsgleichgewicht wird nicht gestört

A	B
Gelfiltration	Dialyse
Adsorptionsmethode	Ultrafiltration (solange nicht mehr
Ultrafiltration	als 1/10 des Gesamtvolumens fil-
Elektrophorese	triert wird [42])
Ultrazentrifuge	

A. Das eingestellte Gleichgewicht [H] + [R] $\rightleftharpoons$ [H-R] wird durch den Trennungsvorgang gestört.

B. Das eingestellte Gleichgewicht wird nicht gestört.

Im folgenden sollen die Bindungsanalysen mit der Kohle-Adsorptionsmethode, als Vertreter der Gruppe A, und mit der Ausgleichsdialyse, als Beispiel für die Gruppe B, durchgeführt werden.

6.1. Die Dextran-Kohle-Adsorptionsmethode

Diese sehr häufig angewandte Methode [43-47] zeichnet sich durch ein rationelles und schnelles Arbeiten aus, womit eine große Anzahl von Meßpunkten in kurzer Zeit erreicht werden kann.
Zur Durchführung der Bindungsanalyse nach dieser Methode wird das radioaktiv markierte Hormon in einem Puffer mit dem jeweiligen Bindungspartner (z.B. Rezeptor) versetzt.
Nach der Einstellung des Bindungsgleichgewichts wird ein Gemisch aus Dextran-Kohle-Puffer für eine festgelegte Zeit zu dieser Lösung gegeben. Diese Dextran-Kohle adsorbiert den freien Anteil an

Hormonen und kann danach mit einer Zentrifuge abgeschleudert werden. Dadurch soll die überstehende Lösung nach dem Abzentrifugieren nur noch den gebundenen Hormonanteil enthalten.
Allerdings wird es nicht möglich sein, die freien Anteile an Hormonen vollständig an die Dextran-Kohle zu adsorbieren, ohne dadurch einen evtl. labilen Hormon-Rezeptor-Komplex zu zerstören; denn das Gleichgewicht (Gl. 1) wird nach der linken Seite verschoben, da [H] aus der Lösung entfernt wird. Die hierdurch mögliche Dissoziation des Hormon-Rezeptor-Komplexes bewirkt, daß für die Dissoziationskonstante K_D ein zu hoher Wert gefunden wird.

Die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit dieser Methode hängen von den Versuchsbedingungen, wie z.B. Rühren, Temperatur, Adsorptionszeit usw. ab, die stets strikt eingehalten werden müssen.

6.2. Die Ausgleichsdialyse

Die Ausgleichsdialyse ist eine Technik zur Bestimmung der Bindungskonstanten, mit der das Bindungsgleichgewicht während des Trennungsvorganges nicht gestört wird.
Mit der Dialyse wird die Tatsache ausgenutzt, daß in einer Lösung, die den Bindungspartner enthält, nur das in freier Form vorliegende Hormon durch eine semipermeable Membran in eine Pufferlösung diffundieren kann. Nach der Einstellung des Dialysegleichgewichtes müßten auf beiden Seiten der Dialysemembran die Konzentrationen an freiem Hormon die gleichen sein. Wird in einer Lösung, die den Bindungspartner enthält, eine höhere Hormonkonzentration gefunden, so wird dieses auf die Bindung des Hormons an den Rezeptor zurück-

geführt.

Normalerweise wird zur Durchführung der Dialyse ein Cellophanschlauch mit der Lösung, die den Bindungspartner enthält, gefüllt, und diese gegen eine Pufferlösung dialysiert. Die Konzentration an Hormon,die in der Pufferlösung außerhalb des Dialyseschlauches gefunden wird, entspricht dem freien, nicht gebundenen Anteil an Hormon.

Die Nachteile dieser Methode sind im technischen Bereich zu suchen. Einmal benötigt man eine hohe Dialysedauer (20-70 Stunden) bis zum Erreichen des Dialysegleichgewichtes, zum anderen werden die Lösungen zu stark verdünnt, so daß die Nachweisgrenze für das betreffende Hormon unterschritten wird.

Ein neues Mikrodialysegerät, mit dem diese Fehler behoben werden, wurde von *Scholtan* [48] konstruiert. Er konnte mit diesem neuen Gerät die Versuchsdauer auf ca. 6 Stunden, d.h. entscheidend herabsetzen und erreichte durch das Verringern des Versuchsvolumens eine erhöhte Meßgenauigkeit.

Mit diesem neuen Dialysegerät sollte man in der Lage sein, die Bindungsanalysen auch mit den relativ instabilen Hormon-Rezeptor-Komplexen in vitro durchführen zu können; denn es kann mit kleinen, konzentrierten Volumina gearbeitet werden, und die Dialysedauer ist sehr kurz geworden, wodurch die Möglichkeit, daß labile Hormon-Rezeptor-Komplexe zerstört werden, z.B. durch Enzyme, herabgesetzt ist.

Somit sind die Voraussetzungen gegeben, daß mit diesem Dialysegerät die Nachteile der anderen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Bindungskonstanten vermieden werden können.

Scholtan untersuchte selbst die Bindungskonstanten von zahlreichen Verbindungen aus verschiedenen Stoffgruppen mit Serumalbumin mit-

tels des neuen Dialysegerätes [49,50].

Er mußte allerdings feststellen, daß bei Untersuchungen mit diversen Hormonen [51] die Dialysemethode mit seinem neu entwickelten Dialysegerät versagte.

Er stellte eine sehr hohe Adsorption der Hormone fest. Hierfür machte er die von ihm eingesetzte Dialysemembran aus Cellophan verantwortlich. Da dieser Fehler scheinbar nicht zu beheben war, führte er die Bindungsanalyse der Hormone mit einer anderen Methode (Ultrazentrifuge) durch.

7. Untersuchungen mit dem Scholtan'schen Dialysegerät

Scholtan zeigte in zahlreichen Untersuchungen [48-50] die eindeutigen Vorteile seines neuen Dialysegerätes bei der Durchführung von Bindungsversuchen auf, womit diese Methodik den anderen Untersuchungsverfahren überlegen ist.
Daher soll zunächst versucht werden, die von ihm beschriebene hohe Adsorption der Hormone an die Dialysemembran, die ein Arbeiten mit dem *Scholtan*'schen Dialysegerät verhinderte, durch Änderung der Versuchsanordnung zu beheben.
Somit könnte man die Vorteile dieser neuen Versuchsmethodik zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Hormonen ausnutzen.

Für die nun folgenden Untersuchungen zur Optimierung des *Scholtan*'schen Dialysegerätes wird bereits jetzt radioaktiv markiertes Östradiol (EST) als Modellsubstanz eingesetzt, da EST auch in allen späteren Versuchen als Standard verwendet werden wird.

Zunächst wird die von *Scholtan* beschriebene Adsorption der Hormone an die Cellophanmembran untersucht. Die Dialyse wird mit C14-EST im Phosphatpuffer (pH-Wert: 7.4) durchgeführt. Nach der Einstellung des Dialysegleichgewichtes, welches nach 5 Stunden erreicht ist, wird die C14-EST-Konzentration in beiden Kammerhälften des Dialysegerätes bestimmt.
Bei dieser Messung zeigte sich, daß 72.2% an C14-EST fehlen, welches demnach adsorbiert worden sein muß.
Es stellt sich nun die Frage, ob C14-EST alleine von der Cellophanmembran adsorbiert worden ist, so wie dieses *Scholtan* vermutet hat, oder ob es doch noch andere Quellen für diese hohe Adsorptionsrate der Hormone gibt.

Um diese Frage klären zu können, werden nun die Membran und die Dialysekammern getrennt auf die Adsorption von C14-EST hin untersucht.

Ein Stück Cellophanmembran, welches die gleiche Größe wie die zur Dialyse eingesetzte Membran hat (25 cm^2), wird in eine Phosphatpufferlösung (pH: 7.4), die eine bekannte Konzentration an C14-EST enthält, gegeben.

Nach 5 Stunden wird die C14-EST-Konzentration in der Lösung erneut bestimmt. Dabei ergibt sich eine Differenz von 7.2% an C14-EST gegenüber der Ausgangskonzentration.

Die Membran wird dann noch für 24 Stunden in derselben Lösung belassen. Danach wird die C14-EST-Konzentration nochmals gemessen; jedoch ergibt sich keine weitere Verminderung an C14-EST in der Pufferlösung.

Das bedeutet, daß nicht die Cellophanmembran für die hohe Adsorption der Hormone verantwortlich gemacht werden kann, so wie es *Scholtan* getan hat [51]. Die Cellophanmembran hat mit 7.2% adsorbiertem C14-EST einen geringen Anteil an der zuvor gemessenen hohen Adsorption von 73% C14-EST während der Dialyse. Demnach müssen noch andere Quellen am Dialysegerät vorhanden sein, die eine derartig hohe Adsorption verursachen.

Um diese nachweisen zu können, wird eine Phosphatpufferlösung, die eine bekannte Konzentration an C14-EST enthält, in die *Scholtan*'sche Dialysekammer gefüllt. Dabei wird keine Dialysemembran eingesetzt, um so nur den Einfluß der Dialysekammer auf die Adsorption des Hormons messen zu können.

Nach 5 Stunden wird die Konzentration an C14-EST erneut in der Kammer bestimmt. Bei dieser Messung fehlen 64% der ursprünglich eingesetzten C14-EST-Konzentration. Das Ergebnis dieses Versuches

zeigt, daß für die hohe Adsorption von C14-EST in erster Linie die Dialysekammer bzw. evtl. auch die Dichtungen zwischen den beiden Kammerhälften verantwortlich sind.
Um zu verdeutlichen, daß die fehlenden C14-EST-Konzentrationen von den Kammerwänden bzw. von den Dichtungen adsorbiert worden sind, werden die Kammern nach dem Einsatz von radioaktivem EST mit einem Scanner der Firma Berthold vermessen.
Hierzu werden die Kammern zunächst dekontaminiert und mit dem Scanner gemessen. Dadurch soll der 0-Wert dieser Messung bestimmt werden (Abb.17). Nun wird die Dialysekammer mit einer radioaktiven Pufferlösung gefüllt. Nach 5 Stunden wird diese Lösung vollständig aus der Kammer abgesaugt, und die Wandungen werden zusätzlich kurz mit Wasser gespült. Nach dem Trocknen der Apparatur wird die Oberfläche der Kammer wiederum auf evtl. adsorbiertes radioaktives EST mit dem Scanner untersucht (Abb.17). Deutlich ist jetzt

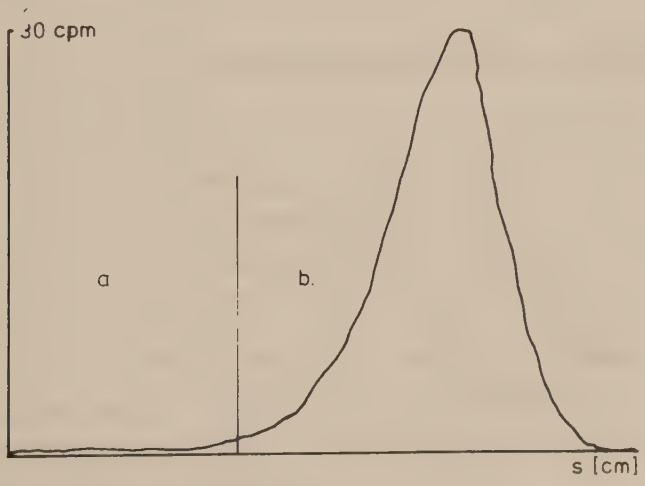


Abb.17. Adsorption von C14-EST an die Wandung der *Scholtan*'schen Dialysekammer: a) Kammer vor der Dialyse, b) Kammer nach der Dialyse

zu sehen, daß das Hormon tatsächlich von Kammerwandung und deren Dichtung adsorbiert worden ist.

7.1. Versuche zur Verminderung der Adsorption von C14-EST

Anhand der vorangegangenen Versuche ergeben sich verschiedene Ansatzstellen, um die hohe Adsorption von C14-EST durch die *Scholtan*'schen Dialysekammern zu vermindern:

1. Pufferzusammensetzung
2. Membranmaterial
3. Kammermaterial
4. Dichtungsmaterial

7.2. Änderung der Pufferzusammensetzung

Die Adsorption von EST an Membran und Wandung der Dialysekammern ist, wie ein weiterer Vorversuch zeigte, stark von der Zusammensetzung des Lösungsmittels abhängig. In diesem Versuch ist anstelle des Phosphatpuffers 40%iges Methanol als Lösungsmittel für C14-EST verwendet worden. Eine Dialyse, die damit in der *Scholtan*'schen Kammer durchgeführt worden ist, erbrachte, daß bei Verwendung dieses Lösungsmittels keine Adsorption von EST zu verzeichnen war.

Allerdings ist es unmöglich, die Bindungsanalysen in einem derartig hochprozentigen alkoholischen Medium durchzuführen. Die eingesetzten Bindungspartner, die ausnahmslos Proteine sind, würden

durch den Alkohol sofort denaturiert werden. Die maximale Konzentration an Alkohol, die als Lösungsvermittler für die Hormone in der Pufferlösung unerläßlich ist, sollte 2‰ nicht überschreiten.

Da dieser Versuch die Vermutung nahelegt, daß die Adsorption von EST von der Polarität des Lösungsmittels abhängig ist, sollte versucht werden, ob durch eine Veränderung der Pufferzusammensetzung die Polarität des Mediums so verändert werden kann, daß eine Verminderung der Adsorptionsrate erreicht werden könnte.

Hierzu werden in Puffern mit verschiedenen Zusammensetzungen und einem bekannten C14-EST-Gehalt gleich große Membranen aus Cellophan (25 cm^2) eingelegt. Nach 5 Stunden wird die Konzentration des Hormons erneut bestimmt.

Die geringste Adsorption von C14-EST wird mit dem Tris-Puffer gemessen (Tab.2.). Dieser Puffer soll nun für alle kommenden Versuche eingesetzt werden.

Nun soll nach einem anderen Material für die Dialysemembran gesucht werden, um die noch verbleibende Adsorption evtl. weiter zu senken.

Tab.2. Abhängigkeit der Membranadsorption von der Pufferzusammensetzung (pH: 7.4; Membrangröße: 25 cm^2)

Puffer	Adsorption von C14-EST (%)
Phosphat	7.2
Imidazol	7.1
Brabital	9.7
Tris-EDTA	4.1
Tris + Albuminlösung (1%)	0
Tris + Sucrose (8%)	6.6
Tris-$MgCl_2$-KCl	13.5
Tris + Dextran (1%)	6.5

7.2.1. Änderung des Membranmaterials

Aus den verschiedenen Membranmaterialien (Tab.3) werden gleich große Stücke (25 cm^2) ausgeschnitten und jeweils in eine Tris-Pufferlösung (pH: 7.4), die eine bekannte Konzentration an C14-EST enthält, eingelegt.
Die Konzentration dieser Lösung wird nach 5 Stunden erneut bestimmt (Tab.3).
Unter den verwendeten Materialien kann jedoch keines gefunden werden, welches sich durch eine geringere Adsorption von C14-EST auszeichnet. Daher wird die bis jetzt eingesetzte Membran aus Cellophan weiterhin für die Dialyse gebraucht werden.

Tab.3. Abhängigkeit der Adsorption vom Membranmaterial im Tris-EDTA-Puffer (pH: 7.4; Membrangröße: 25 cm^2)

Membranmaterial	Adsorption von C14-EST (%)
Polyamid	81.4
regenerierte Cellulose	35.6
Celluloseacetat	86.8
Cellulosenitrat	94.0
Millipore PSED	90.1
Millipore PTGC	91.5
"visking dialyse" Block	24.7
Cellophan	4.6

In den oben beschriebenen Versuchen ist nachgewiesen worden, daß der größte Teil an Hormonen an die Wandung der Dialysekammern adsorbiert wird. Demzufolge muß nun im Anschluß, nachdem die optimale Pufferzusammensetzung und die Membran mit der geringsten Adsorption von EST gefunden worden sind, noch nach einem geeigneten Material für die Dialysekammern und die Dichtungen gesucht werden.

7.2.2. Änderung des Kammermaterials

Hierzu werden Stücke verschiedener Werkstoffe mit gleichen Oberflächen ebenfalls für 5 Stunden in eine Tris-Pufferlösung mit bekanntem C14-EST-Gehalt gelegt.
Die Verminderung der C14-EST-Konzentration nach dieser Zeit erlaubt es, eine Aussage über die Adsorption von C14-EST an den betreffenden Werkstoff machen zu können (Tab.4).
Teflon und Glas sind zwei Werkstoffe, die die geringste bzw. keine Adsorption von C14-EST haben.
Da die Dialysekammern nur sehr schwer aus Glas herzustellen sind, fällt die Entscheidung über das neue Kammermaterial zugunsten von Teflon aus.

Tab.4. Abhängigkeit der Adsorption vom Kammermaterial im Tris-EDTA-Puffer (pH: 7.4; Oberflächen 10 cm²)

Werkstoff	Adsorption von C14-EST (%)
Plexiglas	55.5
Polycarbamat	9.8
PVC	67.9
Polyethylen	70.5
Glas	0
Polyvinylacetat	54.3
Teflon	0

7.2.3. Änderung der Dichtungen

Parallel zu den eben aufgeführten Versuchen ist mit der gleichen Methode nach einem besseren Material für die Dichtungen gesucht worden, das evtl. keine Adsorption aufweist, so wie es die von *Scholtan* [48] verwendeten Dichtungen zwischen den beiden Kammerhälften

bewirken.

Die Suche nach einem optimaleren Werkstoff für diese Dichtungen verlief aber ergebnislos. Daher soll versucht werden, die neuen Kammern aus Teflon derart herzustellen, daß auf eine Dichtung aus einem zusätzlichen Material, das wiederum eine Adsorption fördern könnte, verzichtet werden kann.

8. Konstruktion der neuen Kammern

Die neuen Kammern werden jeweils aus zwei Teflonscheiben, die eine Schichtdicke von 0.4 cm haben, herausgedreht. Das Kammervolumen wird auf 0.8 ml festgelegt und ist somit gegenüber der *Scholtan*'schen Kammer über die Hälfte reduziert worden. Die Stege im Innern der Kammer, die zur Stabilisierung der Membran und zur Konstanthaltung des Flüssigkeitsvolumens dienen, werden jetzt halbkreisförmig gegeneinander versetzt, so daß ein besserer Mischeffekt der Lösung erreicht wird.

Der Versuch, die beiden Teflonkammern direkt miteinander zu verschrauben, scheitert. Die Kammern können so nicht abgedichtet werden.

Um diesen Fehler zu beheben, werden neben die eigentlichen Kammern spezielle Profile aus dem Teflon herausgedreht, welche wie Dichtungen wirken (Abb.18). Da das relativ weiche Teflon nicht direkt miteinander verschraubt werden kann, werden die beiden Teflonscheiben von zwei Metallplatten, die miteinander verschraubt werden, zusammengehalten.

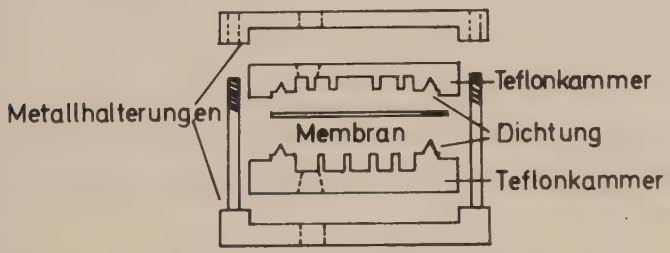


Abb.18. Querschnitt durch die neue Teflonkammer mit Halterung (Original-Maßstab)

Damit die Einstellung des Dialysegleichgewichtes noch beschleunigt werden kann, wird ein zusätzliches Gerät konstruiert (Abb.19),

mit dem die Teflonkammern während der Dialyse mit konstantem Umlauf (40 Upm) gedreht werden können.

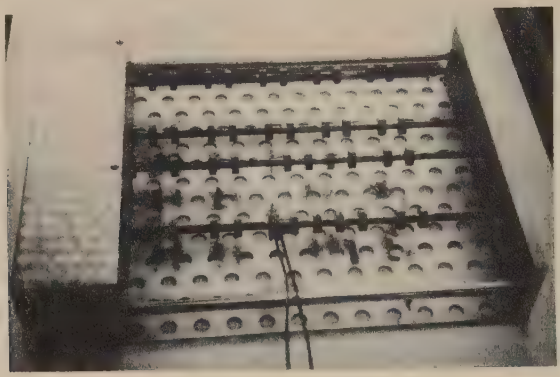


Abb.19. Vorrichtung zum Drehen der Teflonkammern

8.1. Dialyse mit den neuen Kammern

Zunächst soll die Zeit bestimmt werden, die notwendig ist, um das Dialysegleichgewicht mit den neuen Kammern einzustellen. Dazu wird eine Ausgleichsdialyse mit C14-EST im Tris-Puffer durchgeführt.

Während die eine der beiden Kammerhälften mit Tris-Puffer gefüllt wird, wird die andere Kammerhälfte mit C14-EST-haltigem Tris-Puffer versetzt. Nach festgelegten Zeiten wird die Dialyse unterbrochen, und die Konzentrationen in beiden Kammerhälften werden bestimmt (Abb.20).
Nach bereits 2.5 Stunden hat sich das Dialysegleichgewicht eingestellt.
In einem zusätzlichen Versuch kann gezeigt werden, daß sich diese Zeit, die zur Einstellung des Gleichgewichtes benötigt wird, ver-

längert, sobald die Dialysekammern nicht gedreht werden (Abb.21).

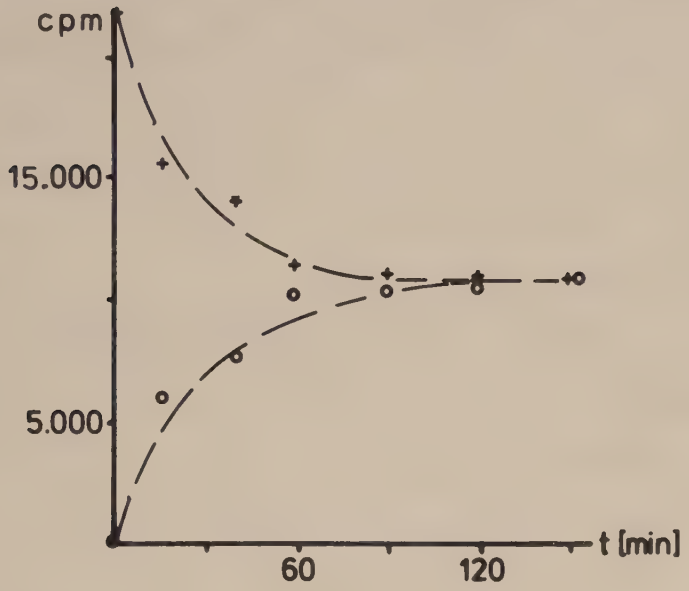


Abb.20. Bestimmung der Dialysezeit der Teflonkammern mit Drehen

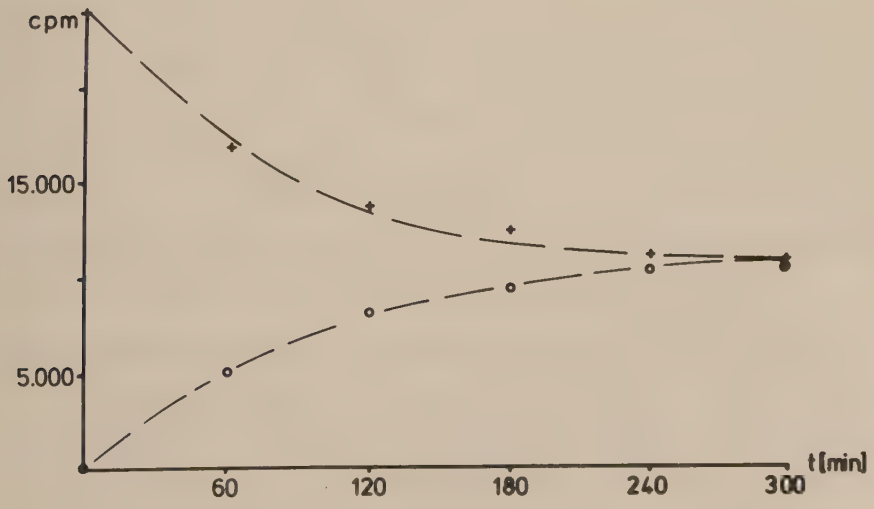


Abb.21. Bestimmung der Dialysezeit der Teflonkammern ohne Drehen

In Abb.20 ist zu erkennen, daß auch mit den neuen Kammern während der Dialyse noch ein kleiner Teil an C14-EST adsorbiert wird (ca. 7%). Es soll überprüft werden, welche Teile der Dialysekammer dafür verantwortlich sind.

Mit dem Scanner wird nun erneut die evtl. Adsorption an die Kammerwandungen gemessen. Hierzu werden die Kammeroberflächen wiederum vor und nach der erfolgten Dialyse mit C14-EST auf evtl. adsorbierte Anteile untersucht.

Dabei ist eine sehr deutliche Reduzierung der zuvor bei den *Scholtan*'schen Kammern festgestellten Adsorptionen von C14-EST zu erkennen (Abb.22).

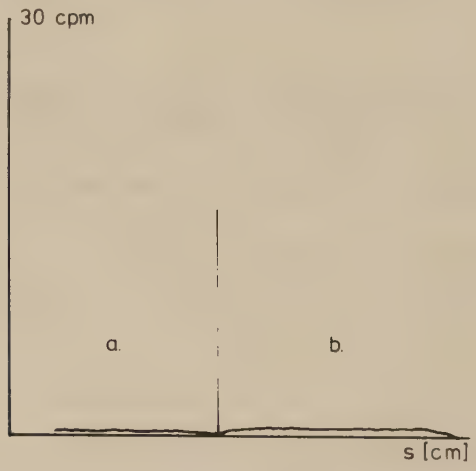


Abb.22. Adsorption von C14-EST an die Wandung der Teflonkammer: a) Kammer vor der Dialyse; b) Kammer nach der Dialyse

Das bedeutet, daß für die verbleibenden 7% Adsorption mit den neuen Teflonkammern alleine die Dialysemembran verantwortlich sein muß. In danach wiederholt durchgeführten Dialysen mit C14-EST in den neuen Kammern - auch mit verschiedenen Konzentrationen des Hormons - kann sicher gestellt werden, daß dieser Wert von 7% Ad-

sorption konstant bleibt.

Um die Wirksamkeit der neuen Teflonkammern prüfen zu können, sollen die ersten Bindungsversuche mit C14-EST an Rinderalbumin (BSA) durchgeführt werden.

8.2. Bestimmung der Bindungskonstanten von EST mit BSA in den neuen Teflonkammern

BSA ist ein Protein, das aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebaut ist [52,53]. Das Molekulargewicht liegt zwischen 62.000 und 67.000. BSA geht überwiegend unspezifische Bindungen ein, d.h. das Protein macht keine großen Unterschiede zwischen Struktur, Konformation sowie Ladung und Elektronenverteilung einzelner Verbindungen, mit denen es einen Komplex bilden kann. Dieses Verhalten bedeutet, daß eine Vielzahl verschiedener und nicht miteinander verwandter Liganden von BSA gebunden werden können. Ein weiteres Merkmal einer unspezifischen Bindung ist die Tatsache, daß BSA mit den Hormonkonzentrationen, die im physiologischen Bereich liegen, nicht abgesättigt werden kann.

Für die Bindungsfähigkeit der Albumine sind vor allem zwei Eigenschaften [54] verantwortlich:

1. die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins und
2. die konformative Anpassung dieser Proteine bei der Ausbildung einer Ligandenbindung, die zuerst von *Karush* [55] postuliert worden ist.

8.2.1. Durchführung der Bindungsversuche

Diese Bindungsversuche von EST an BSA sollen zur Berechnung der Bindungskonstanten dienen, um somit anhand von bereits bekannten Untersuchungsergebnissen dieser Bindungsanalysen zunächst Aufschluß über die Arbeitsweise der neuen Dialysekammern zu erhalten.
Danach werden die Membranen, wie auch alle anderen Arbeitsgeräte, autoklaviert; durch diese Sterilisation soll eine zu schnelle Denaturierung der Proteine, die man bei den Bindungsanalysen einsetzt, verhindert werden.
Die Dialysekammern werden, nachdem die Dialysemembran eingelegt worden ist, verschlossen und können nun gefüllt werden.
In die eine Hälfte der Kammern wird die Pufferlösung, die 1% BSA enthält, pipettiert, während die andere Kammerhälfte nur mit dem Tris-Puffer, dem steigende Konzentrationen an C14-EST zugefügt sind, beschichtet wird (Abb.23).

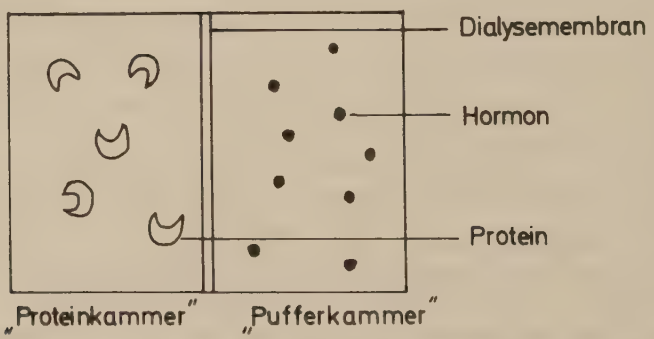


Abb.23. Situation in der Dialysekammer zu Beginn der Dialyse

Die Dialysekammern werden bei 37°C (± 1°C) 6 Stunden lang gedreht (40 Upm).
Um die Höhe der Adsorption von C14-EST bestimmen zu können, werden

jeweils Dialysen in Kammern durchgeführt, die entweder in beiden Kammerhälften eine Pufferlösung oder eine Proteinlösung enthalten. Gleichzeitig kann damit die Einstellung des Dialysegleichgewichtes und somit das Ende der Dialysezeit überprüft werden.

Nach Beendigung der Dialyse werden jeweils aus den beiden Kammerhälften der Dialysegeräte Proben entnommen. Sie werden mit Szintillator (Miniria 20) vermischt und für 30 Minuten zur Stabilisierung der Meßflüssigkeit im Dunkeln aufbewahrt. Danach werden die Proben im Coromatic 200 der Firma Tracerlab Instruments gemessen. Die erforderliche Quenchkorrektur der Proben wird für jeden Dialyseversuch erneut vorgenommen.
Hierzu werden ungequenchte Proben von C14-EST gemessen, und danach werden gleiche Mengen an Puffer bzw. Proteinlösung, die ein Quenchen verursachen, hinzugegeben. Die dadurch erfolgte Verminderung der Zählrate ergibt den Quenchkorrekturfaktor. Er ist von der Höhe der eingesetzten C14-EST-Konzentration unabhängig.

8.2.2. Berechnung der Bindungskonstanten

Der Berechnung der Bindungskonstanten liegt die folgende Überlegung zugrunde:
Nach der Einstellung des Dialysegleichgewichtes bestehen in den Dialysekammern folgende Situationen (Abb.24):
Zum einen hat sich das Dialysegleichgewicht zwischen der "Pufferkammer" (sie hat nur den Tris-Puffer mit C14-EST enthalten) und der "Proteinkammer" (in diese ist die Proteinlösung gefüllt worden) aufgebaut; zum anderen hat sich das Gleichgewicht

$$[H] + [R] \rightleftharpoons [H - R]$$

in der "Proteinkammer" eingestellt.

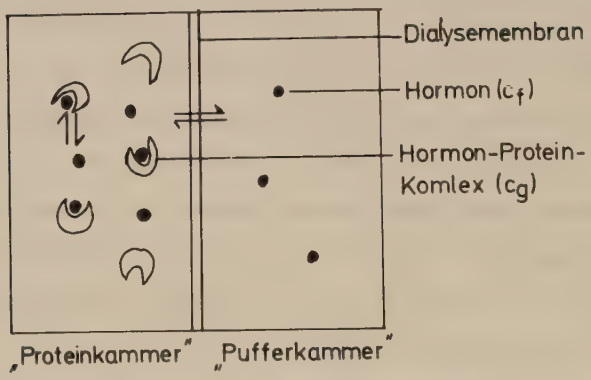


Abb.24. Situation in der Dialysekammer nach Einstellung des Dialysegleichgewichtes

Die in der "Proteinkammer" gefundene Konzentration an C14-EST setzt sich aus dem freien und dem gebundenen Anteil des Hormons zusammen:

$$c_{ges.} = c_f + c_g$$

Die Konzentration an C14-EST, die in der "Pufferkammer" gemessen worden ist, entspricht aufgrund des Dialysegleichgewichts dem freien, ungebundenen Anteil des Hormons in der "Proteinkammer".

Der an das Albumin gebundene Anteil c_g berechnet sich demnach aus

$$c_g = c_{ges.} - c_f$$

$c_{ges.}$ = Konzentration in der "Proteinkammer"
c_f = Konzentration in der "Pufferkammer"
c_g = Konzentration des gebundenen Hormons

Somit stehen alle Größen, die zur Erstellung der Graphik nach *Scatchard* [32] notwendig sind, fest. Aus der Geraden (Abb.25) können nun die Bindungskonstanten K_A und K_D sowie die Anzahl der Bindungsstellen bestimmt werden (Tab.5).

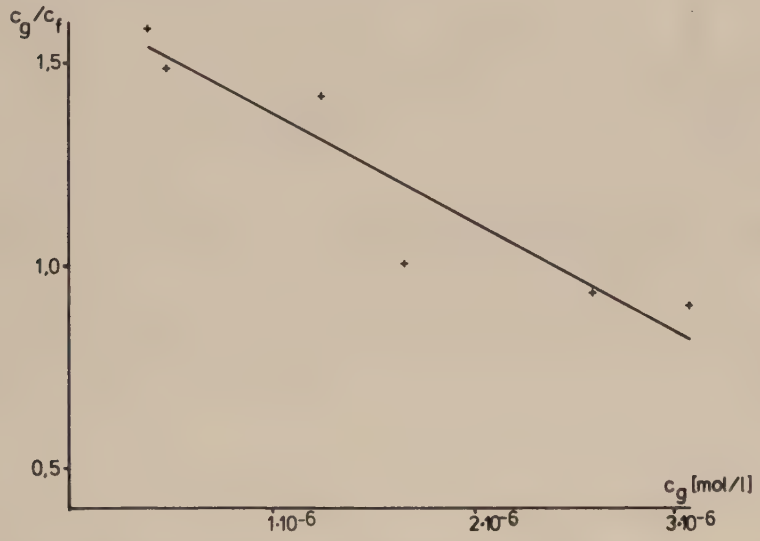


Abb.25. Darstellung der Bindungsanalyse von C14-EST und BSA nach *Scatchard*

Tab.5. Bindungskonstanten von DES und EST mit BSA (Dialysemethode)

Verbindung	K_A (mol^{-1})	K_D (mol)	n (mol/g)
DES	$9.99 \cdot 10^{4}$	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$1.01 \cdot 10^{-6}$
EST	$2.64 \cdot 10^{5}$	$3.79 \cdot 10^{-6}$	$3.11 \cdot 10^{-7}$

Die Darstellung nach der "proportion graph method" ergibt eindeutig das Kurvenbild eines unspezifisch bindenden Systems, welches in der Tat mit BSA auch vorgelegen hat (Abb.26).

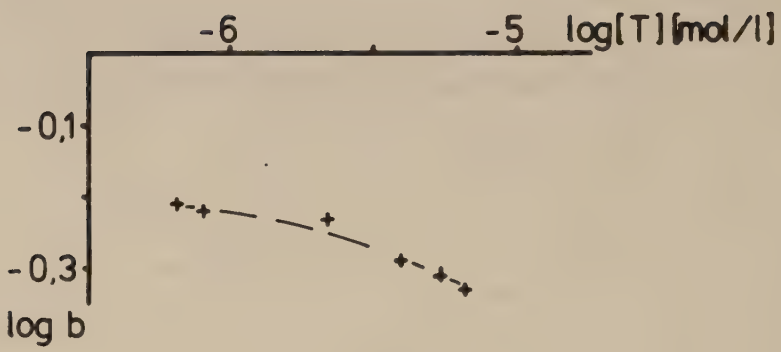


Abb.26. Darstellung der Bindungsanalyse von C14-EST mit BSA nach "proportion graph method"

In gleicher Weise werden dann auch noch mit den neuen Dialysekammern die Bindungskonstanten von Diethylstilböstrol (DES) mit BSA bestimmt (Abb.27).

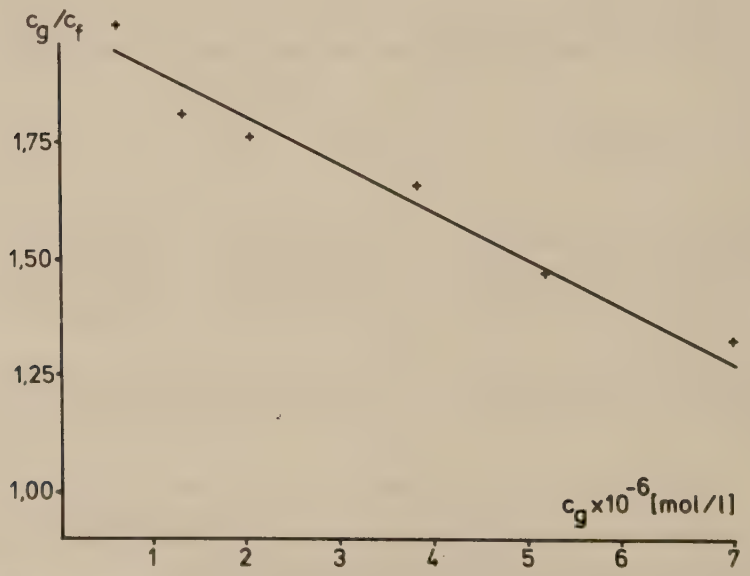


Abb.27. Darstellung der Bindungsanalyse von C14-DES nach *Scatchard*

9. Bestimmung der Bindungskonstanten mit der Adsorptionsmethode

Die in der Literatur am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung der Bindungskonstanten ist die Adsorptionsmethode mit Dextran-Kohle.

Diese Untersuchungsmethode gehört, wie eingangs schon erwähnt, zu der Gruppe, die durch die zur Bestimmung der Bindungskonstanten notwendigen Trennung von freiem und gebundenem Hormon das Bindungsgleichgewicht stören. Sie soll als Vertreter dieser Gruppe herangezogen werden, um die Ergebnisse, die damit erzielt werden, mit denen aus den Versuchen mit den neuen Dialysekammern zu vergleichen.

10. Durchführung der Bindungsanalyse mit der Adsorptionsmethode

Zunächst wird die Pufferlösung, die das BSA enthält, mit dem Hormon versetzt und bis zum Erreichen des Gleichgewichts zwischen gebundenem und freiem Hormon bei 37°C stehengelassen.
Danach werden zu jeweils gleichen Teilen dieser Lösung konstante Mengen des Adsorptionsgemisches gegeben. Die Proben werden nach vorgegebenen Zeiten in einer Zentrifuge abgeschleudert. Dabei sedimentiert die Dextran-Kohle, an die das freie Hormon adsorbiert worden ist, vollständig auf den Boden des Zentrifugenröhrchens. Die überstehende Lösung enthält nun den Hormon-Protein-Komplex. Dieser Lösung wird eine Probe entnommen, die zur quantitativen Auswertung dient. Die Quenchkorrektur erfolgt in gleicher Weise, wie auf S.43 bereits beschrieben worden ist.
Diese Versuchsmethodik birgt nun zwei Fehlerquellen in sich (Abb. 28).

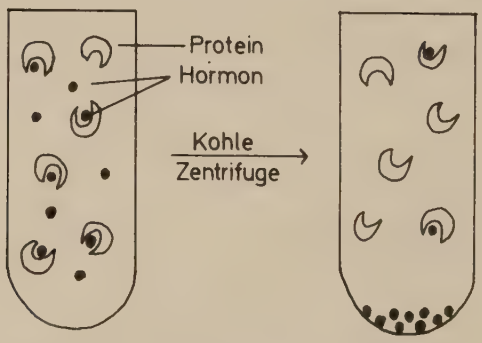


Abb.28. Das Adsorptionsgemisch kann schwache Hormonkomplexe zerstören, und das freigesetzte Hormon wird mit abgeschleudert.

1. Mit der Dextran-Kohle wird der freie Anteil des Hormons adsorbiert und dann abgeschleudert. Dadurch wird die Gleichgewichtsreaktion $[H] + [R] \rightleftharpoons [H\text{-}R]$ nach der linken Seite verscho-

ben. Dieses hat zur Folge, daß schwache Hormon-Protein-Komplexe dissoziieren, und man erhält somit für c_g zu kleine Werte.

2. Zwischen dem Hormon-Kohle-Komplex und dem freien Hormon bildet sich ebenfalls ein Bindungsgleichgewicht:

$$[H] + [\text{Kohle}] \rightleftharpoons [H - \text{Kohle}]$$

Nach dem Abschleudern des schweren Hormon-Kohle-Komplexes bleibt ein geringer Anteil an freiem Hormon in der überstehenden Lösung zurück. Dadurch kann sich der in der Bindungsanalyse gemessene Wert von c_g um diesen Betrag erhöhen.

Den letzteren der beiden Fehler kann man allerdings experimentell ermitteln und daher bei der Berechnung der Bindungskonstanten berücksichtigen:

Einer Pufferlösung, die zusätzlich nur H3-EST enthält, wird das Adsorptionsgemisch zugegeben. Da in diesem Fall nur ungebundenes, freies Hormon vorhanden ist, sollte dieses vollständig an die Dextran-Kohle gebunden werden können, so daß nach erfolgtem Zentrifugieren in der überstehenden Lösung kein H3-EST gefunden werden sollte.

Der Versuch zeigt jedoch, daß 1.05% der ursprünglich eingesetzten H3-EST-Konzentration im Überstand nachgewiesen werden können. Dieser Anteil stammt aus dem Gleichgewicht $[H] + [\text{Kohle}] \rightleftharpoons [H\text{-Kohle}]$ und konnte als freies, ungebundenes Hormon bei der vorgelegten Drehzahl der Zentrifuge nicht mit abgeschleudert werden.

Bei den folgenden Bindungsversuchen mit der Dextran-Kohle muß dieser Wert erneut bestimmt werden und in die Berechnung der Bindungskonstanten einbezogen werden.

Für den zuerst genannten Fehler gibt es allerdings keine Möglich-

keit, ihn experimentell zu korrigieren.

Am Beispiel des BSA als Bindungspartner für EST soll dieser Fehler erläutert werden:

Eine Pufferlösung, die 1% BSA enthält, wird mit H3-EST versetzt. Nach 6 Stunden bei 2°C, die zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes angesetzt worden sind [44], werden jeweils gleiche Teile dieser Lösung mit dem Adsorptionsgemisch vermischt. Nach vorgegebenen Zeiten werden die Proben abgeschleudert.

Nach relativ kurzer Zeit ist das eingesetzte H3-EST nahezu vollständig an die Dextran-Kohle adsorbiert und abgeschleudert worden (Abb.29); das bedeutet, daß das Adsorptionsgemisch zunächst den freien Anteil des Hormons aufgenommen hat. Hierdurch kommt es zu

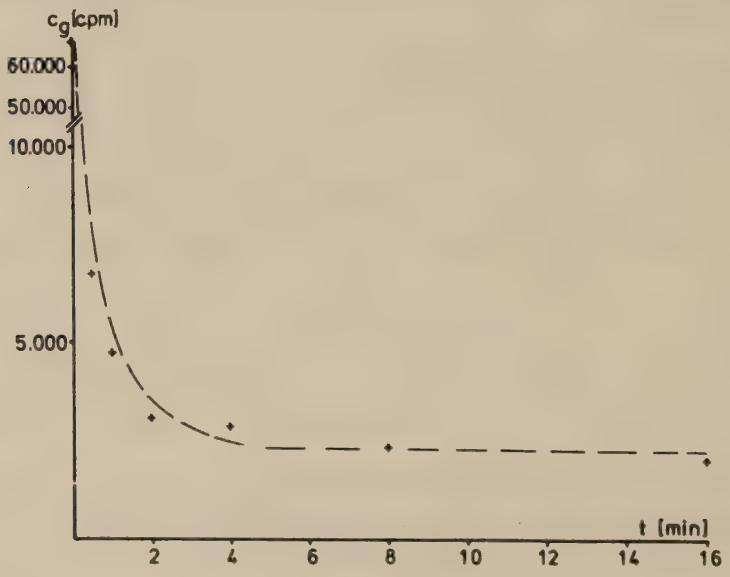


Abb.29. Adsorption von H3-EST mit Dextran-Kohle aus einer Rinderalbuminlösung

einer raschen Dissoziation des schwachen Hormon-BSA-Komplexes, und das zuvor gebundene Hormon wird ebenfalls adsorbiert und abgeschleudert. Somit wird der Hormon-Protein-Komplex zerstört, und die Bindungskonstanten können mit dieser Methode nicht bestimmt werden. Dieses kann dann mit der Dialysemethode durchgeführt werden.

In Zukunft sollen die Bindungsanalysen aber nicht mit BSA als Bindungspartner durchgeführt werden, da das Protein nur unspezifische Bindungen einzugehen vermag. Aus diesem Grund soll mit dem Rezeptor gearbeitet werden, der in der Lage ist, die östrogenen Hormone aufgrund deren verschiedenen Strukturen zu unterscheiden und zu binden.

11. Die Gewinnung des Rezeptors

Alle nachfolgenden Arbeiten mit dem Rezeptor müssen bei 0-4°C durchgeführt werden. Der Grund hierfür liegt in der äußerst großen Instabilität des Rezeptors, der, ist er einmal aus seinem Zellverband isoliert, sehr rasch zerstört wird. Das Arbeiten bei diesen tiefen Temperaturen verzögert diesen Prozeß.

Um bei 0°C arbeiten zu können, wird ein Gerät gebaut, in dem auch ohne größeren Aufwand im normalen Labor bei diesen tiefen Temperaturen gearbeitet werden kann.

Aus Chromstahl wird eine nach einer Seite hin offene, doppelwandige Box geschweißt. Zwischen beide Wandungen werden zuvor noch Ringe aus dem gleichen Metall befestigt, die bewirken sollen, daß die Wände der Box stets den gleichen Abstand voneinander haben. An zwei sich gegenüberliegenden Ecken der Box werden die Anschlußstutzen für Zu- und Ablauf geschweißt.

Mit einem Abstand von ca. 3 cm wird um diese Metallbox eine zweite Wanne aus Kunststoff gebaut. Der Zwischenraum zwischen beiden Behältern wird mit Styropur aufgefüllt. Diese Maßnahmen dienen zur Isolierung der Kälte innerhalb der Kühlbox (Abb.30).

Vor die offene Seite der Box wird ein "Vorhang" aus einer Plastikfolie geklebt. Dieser ermöglicht das Arbeiten in der Kühlbox und verhindert weitgehend das Ausströmen der Kälte. Im Innenraum ist ein kleiner Ventillator angebracht, der für eine gleichmäßig verteilte Kaltluft sorgt.

Durch die Doppelwandung der Metallbox wird nun mit einem Kryostaten gekühltes Ethanol gepumpt. Etwa nach 50 Minuten ist der Luftraum in der Box bereits auf 0°C abgekühlt und bleibt mit $\pm$1°C konstant. Der Kälteverlust im Innern der Box gegenüber der Kühlflüssigkeit beträgt nur ca. 2°C.

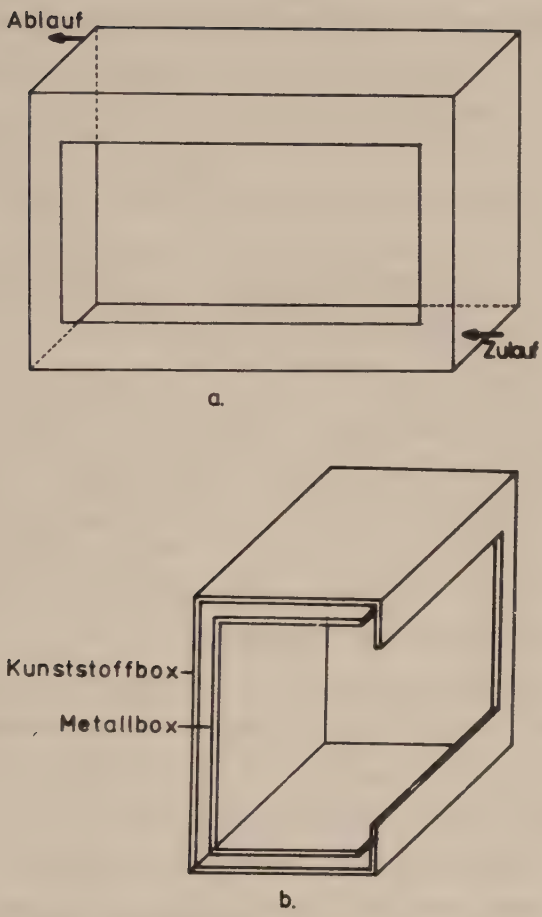


Abb.30. Kühlbox: Frontansicht (a), Querschnitt (b) (Maßstab 1:10, schematisch)

Mit dieser Apparatur steht nun ein handliches und rationell arbeitendes Gerät für das Arbeiten bei $0^{\circ}C$ zur Verfügung. Zudem ermöglicht die Apparatur, da auf einen Kühlraum verzichtet werden kann, daß alle Arbeiten, die nicht bei $0^{\circ}C$ durchgeführt werden müssen, in unmittelbarer Nähe erfolgen können; dieses hat vor allem bei den Arbeiten mit radioaktivem Material große Vorteile.

Für die Gewinnung des Rezeptors wird im Schlachthof das Uterusgewebe von frisch geschlachteten Rindern geholt. Das Gewebe wird für den Transport in das Labor sofort im Schlachthaus in Eis eingelegt.
Alle Geräte, die nun im Labor verwendet werden sollen, werden zuvor gekühlt. Dann wird das Bindegewebe entfernt, und das restliche Gewebe wird im eiskalten Tris-Puffer, dem Thioglycol als Stabilisator zugesetzt worden ist, gewaschen.
Dann wird das Gewebe zerkleinert und im Puffer mit einem Ultraturax homogenisiert. Dabei wird in Intervallen, die nicht länger als 10 Sekunden dauern, gearbeitet, um ein Erwärmen des Homogenats zu verhindern. Zwischendurch wird in einer Kältemischung gekühlt.

Das fertige Homogenat wird mit der Ultrazentrifuge bei 2°C mit 105.000 g 45 Minuten lang abgeschleudert.
Der Uberstand im Zentrifugenröhrchen, das sog. "supernatant", enthält den Cytosolrezeptor [45]; allerdings sind bei dieser Aufarbeitung des Gewebes noch zusätzlich andere, nicht zentrifugierbare Zellbestandteile im "supernatant" enthalten.
In einer etwa 2 mm starken Schicht ist dem "supernatant" eine milchige Zone überlagert, die Lipide enthält. Diese dürfen bei der Entnahme des "supernatants" nicht mit aufgenommen werden.

Mit dem "supernatant" steht nun eine rohe Cytosolrezeptor-Aufbereitung zur Verfügung, mit der die Bindungsanalysen durchgeführt werden können.
Zuerst sollen die Bindungskonstanten von H3-EST und dem Cytosolrezeptor mit der Adsorptionsmethode bestimmt werden.

11.1. Bestimmung der Bindungskonstanten mit der Adsorptionsmethode

Zuerst muß die Zeit festgelegt werden, mit der das Adsorptionsgemisch auf das "supernatant" nach der Zugabe von H3-EST einwirken soll.

Alle Versuche werden jetzt in der Kältebox bei 2°C durchgeführt, um ein evtl. Einfrieren der Lösungen bei 0°C zu vermeiden.

Für die Bestimmung der Adsorptionszeit wird zuerst dem "supernatant" H3-EST zugegeben. Diese Lösung wird in gleiche Teile geteilt und bis zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes 6 Stunden bei 2°C stehengelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wird jeder Probe das Adsorptionsgemisch zugegeben. Die Proben werden langsam gedreht, um ein vorzeitiges Absetzen der Kohle zu verhindern. Nach den vorgegebenen Zeiten werden die einzelnen Proben in der Zentrifuge abgeschleudert. Aus der überstehenden Lösung wird jeweils die Probe für die Messung entnommen.

Die Kohle hat sehr rasch einen gewissen Teil des H3-EST adsorbiert (Abb.31). Aber bereits nach ca. 5 Minuten wird nur noch ein geringer Teil des Hormons aufgenommen; in der Kurve bildet sich ein Plateau aus. Das bedeutet, daß die Kohle im ersten Abschnitt nicht nur das freie Hormon, sondern auch den Teil adsorbiert hat, der unspezifisch gebunden war, da diese Komplexe zerstört worden sind. Hingegen wird der spezifische EST-Rezeptor-Komplex erhalten, und es kann vom Adsorptionsgemisch nur noch sehr wenig Hormon aufgenommen werden. Auch ein längeres Einwirken des Adsorptionsgemisches zerstört den Komplex nur sehr langsam.

Somit kann die Adsorptionszeit der Dextran-Kohle auf 12 Minuten festgelegt werden. Diese Zeit ist ein Kompromiß zwischen der Zeit,

die erforderlich ist, möglichst alle unspezifischen Bindungen zu zerstören, und der Zeit, in der der spezifische EST-Rezeptor-Komplex noch erhalten bleibt.

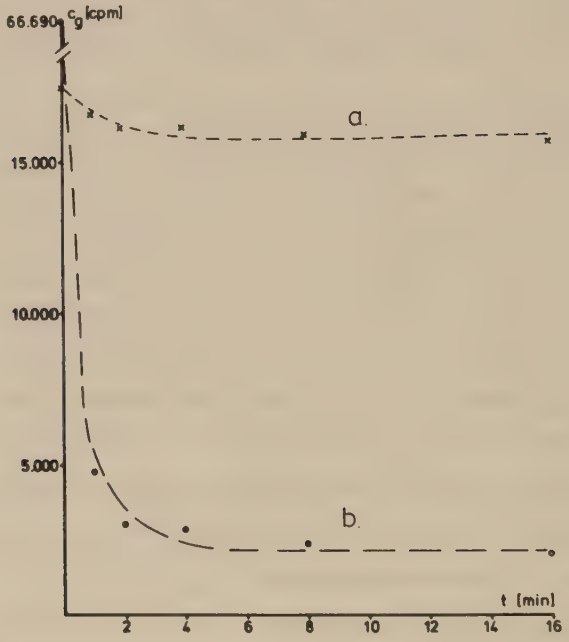


Abb.31. Adsorption von H3-EST aus: a) "supernatant", b) BSA-Lösung

In Abb.31 ist sehr deutlich die unterschiedliche Wirkung dieser Methode für einen unspezifischen Bindungspartner (hier BSA) und einem spezifisch bindenden System ("supernatant") zu sehen. Während für den Versuch mit dem "supernatant" schon nach kurzer Zeit ein Plateau in der Kurve erreicht werden kann, fällt die Kurve für das unspezifisch bindende System ständig ab. Ein echtes Plateau kann nicht erzielt werden.

Nun sollen die Bindungskonstanten von H3-EST mit dem Rezeptor bestimmt werden.

Hierzu werden gleichen Volumina "supernatant" steigende Konzentrationen an H3-EST zugesetzt. Dafür werden von einer Stammlösung, die eine bekannte Konzentration an H3-EST gelöst in Methanol enthält, in die Probenröhrchen pipettiert. Das Lösungsmittel wird anschließend bei 40°C mit N_2-Gas abgeblasen, um die Unterschiede der Versuchsvolumina auszugleichen. Die Proben werden dann erneut mit gleichen Teilen Methanol versetzt, um das H3-EST wiederum zu lösen. Nun werden die Proben auf 0°C abgekühlt und mit dem "supernatant" vermischt.

Die Röhrchen bleiben bei tiefen Temperaturen (2°C) für 6 Stunden stehen. Nach Ablauf der Zeit wird das Adsorptionsgemisch zugegeben, und die Proben werden 12 Minuten in der Kühlbox gedreht. Danach werden alle Proben sofort mit der Zentrifuge abgeschleudert. Aus der überstehenden Lösung werden die gleichen Volumina für die Messung entnommen.

Für die Berechnung der Bindungsstellen ist noch die Konzentration des Rezeptors notwendig. Da sich diese aber sehr schlecht bestimmen läßt, da neben den Rezeptorproteinen noch andere Proteine, z.B. Albumin im "supernatant" enthalten sein können, wird der Gesamtgehalt der Proteine im "supernatant" bestimmt.

Diese Gehaltsbestimmung wird nach der Methode von *Lowry* [33] durchgeführt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Farbreaktion, bei der ein Komplex zwischen den Proteinen und dem Folin-Reagenz gebildet wird. Dieser blaue Farbkomplex kann bei 723 nm spektralphotometrisch vermessen werden.

Die Eichkurve für diese quantitative Bestimmung ist mit Rinderalbumin erstellt worden.

11.2. Berechnung der Bindungskonstanten

Für die Berechnung der Bindungskonstanten nach *Scatchard* [32] müssen die Größen $c_{ges.}$, c_f, c_g und die Proteinkonzentration bekannt sein. Sie werden wie folgt bestimmt:

Die Meßergebnisse der Proben aus dem letzten Versuch ergeben den an den Cytosolrezeptor gebundenen Hormonanteil c_g. Allerdings müssen diese Meßergebnisse zuvor noch korrigiert werden, wie dieses auf Seite 49 beschrieben ist.

Der Wert für c_g wird experimentell bestimmt. Zu jeder Probe, die mit dem Adsorptionsgemisch behandelt wird, läuft parallel eine zweite Probe mit gleicher Konzentration an H3-EST, der anstelle des Dextran-Kohle-Gemisches Tris-Puffer zugefügt worden ist. Diese Probe wird dann analog der ersten Probe behandelt und ergibt den Wert für $c_{ges.}$, Mit dieser Maßnahme werden evtl. Pipettierfehler und Quenchungen der Zählrate korrigiert.

Aus einer dazu parallel laufenden Standardprobe wird für jede Titration ein Korrekturfaktor berechnet. Dieser Faktor bleibt innerhalb einer Meßreihe konstant. Mit ihm werden alle Meßdaten, die von dem Corumatic 200 ausgedruckt werden, korrigiert.

Die für die graphische Auswertung nach *Scatchard* [32] noch wichtige Größe c_g berechnet sich nun aus:

$$c_f = c_{ges.} - c_g$$

Entgegen den Erwartungen kann man aber die einzelnen Meßpunkte in der Graphik (Abb.32) nicht zu einer Geraden verbinden; sondern es ergibt sich eine durchgebogene Kurve. Diese Kurve kann allerdings in zwei Geraden zerlegt werden, die unterschiedliche Steigungen haben (siehe Abschnitt S. 87 ff).

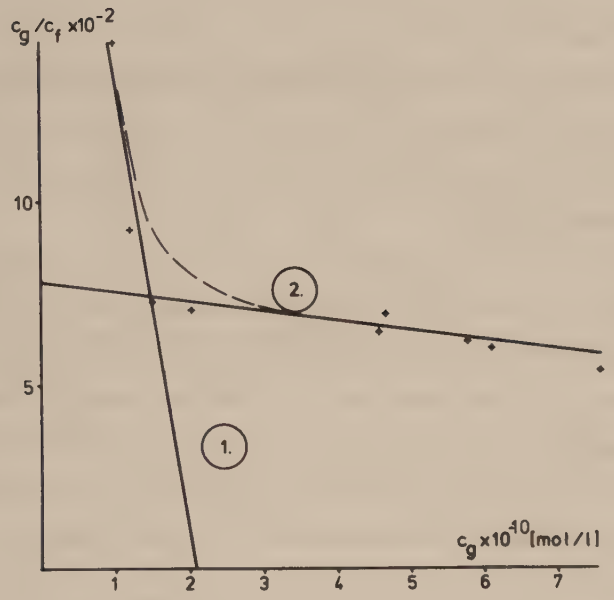


Abb.32. Bindungsanalyse von H3-EST mit "supernatant" nach *Scatchard* (Gl. 4); Gerade 1 wurde aus den Meßwerten 1-3 berechnet, Gerade 2 aus den Meßwerten 3-9.

Demnach müssen im titrierten System entweder zwei oder mehr Bindungspartner oder aber ein Bindungspartner mit verschiedenen Bindungsstellen vorgelegen haben.

Fest steht, daß es sich bei diesem "supernatant" um kein einheitlich bindendes System gehandelt hat.

Theoretisch könnte zum Beispiel das Serumalbumin dafür verantwortlich sein, daß mit Sicherheit noch mit anderen nichtzentrifugierbaren Zellbestandteilen in der noch rohen Gewebeaufbereitung verbleibt.

Allerdings sollte das Adsorptionsgemisch in der Lage gewesen sein, diese evtl. unspezifisch eingegangenen Bindungen des H3-EST zu zerstören, so daß nur die spezifisch bindenden Anteile des Systems

gemessen werden.

Aufschluß über die Art dieser bindenden Systeme, die bei dieser Titration erfaßt worden sind, können evtl. die Bindungskonstanten geben, die sich aus den beiden Geraden (Assymtoten) (Abb.32) berechnen lassen (Tab.6).

Die Konstanten, die sich aus der Geraden mit der steileren Steigung berechnen lassen, zeigen, daß in diesem Bereich es sich nur um ein spezifisch bindendes System handeln kann, welches von H3-EST erfaßt worden ist. Die Bindungskonstanten der anderen Gerade liegen außerhalb der Größenordnung, die für ein spezifisch bindendes System zugelassen ist [18]. Sie sind allerdings mit den Bindungskonstanten des Albumins vergleichbar [56].

Tab.6. Bindungskonstanten von EST mit "supernatant" (Adsorptionsmethode)

	K_A (mol^{-1})	K_D (mol)	n (mol/g)
1.Gerade	$1.27 \cdot 10^{9}$	$7.88 \cdot 10^{-10}$	$9.88 \cdot 10^{-12}$
2. Gerade	$2.88 \cdot 10^{7}$	$3.47 \cdot 10^{-8}$	$1.30 \cdot 10^{-10}$

Um eine endgültige Aussage treffen zu können, ob diese zweite Gerade ein spezifisch oder ein nichtspezifisch bindendes System darstellt, soll die graphische Darstellung nach der "proportion graph method" herangezogen werden (Abb.33). Dieses Kurvenbild zeigt, daß bei der vorangegangenen Titration mit H3-EST vermutlich ein spezifisch bindendes neben einem unspezifisch bindenden System erfaßt worden ist.

Dieses würde bedeuten, daß das Adsorptionsgemisch bei den vorgelegten H3-EST-Konzentrationen und der gegebenen Adsorptionszeit

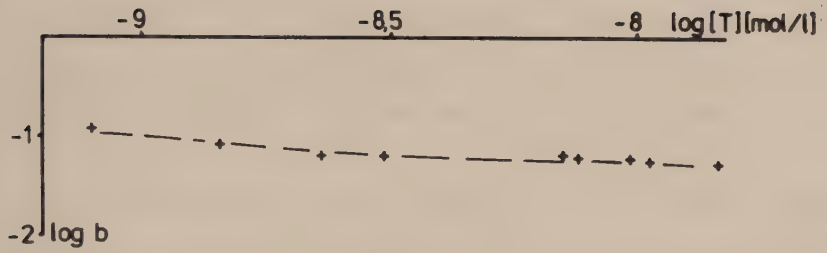


Abb.33. Bindungsanalyse von H3-EST im "supernatant" nach "proportion graph method"

nicht in der Lage gewesen ist, die unspezifisch bindenden System(e) vollständig zu zerstören.
Vergleicht man jedoch die Adsorptionskurve von Albumin (Abb.29), so ist daraus zu ersehen, daß bei einer Adsorptionszeit von 12 Minuten der zuvor gebildete Hormon-Albumin-Komplex so gut wie zerstört ist. Demzufolge könnten noch andere Zellbestandteile, die sich im "supernatant" befinden, in Frage kommen, die EST unspezifisch binden können und dadurch diese Bindungsanalyse stören können.
Aufschluß darüber sollen die nun folgenden Versuchsreihen geben:

Für den Fall, daß kein unspezifisch bindendes System im "supernatant" vorhanden ist, muß man bei einer Steigerung der Konzentration von H3-EST in den Sättigungsbereich des Rezeptors kommen, in dem trotz weiterer Hormonzugabe keine weiteren Bindungen im System erfolgen.
Um dieses zu überprüfen, wird die Titration des "supernatants" mit hoher H3-Konzentration vorgenommen (Abb.34). In diesem Bereich müßte der EST-Rezeptor abgesättigt sein, und es dürfte zu keiner Steigerung der Bindungen kommen.

Es wird, wie erwartet, auch bei dieser hohen Hormonkonzentration kein Sättigungsbereich erreicht (Abb.34).

Die Auswertung der Bindungskonstanten dieser Titration nach *Scatchard* [32] ergeben für K_D einen Wert von $1.37 \cdot 10^{-7}$ mol. Dieses Ergebnis stimmt in der Größenordnung mit dem, der für die Dissoziationskonstante des BSA als unspezifischem Bindungspartner erreicht worden ist [56], überein und ist zudem vergleichbar mit dem Wert für K_D, der für die korrigierte zweite Gerade aus Abschnitt 14, S.87 f berechnet worden ist.

Die Darstellung nach der "proportion graph method" (Abb.34c) ergibt zudem, daß es sich bei der letzten Titration um ein unspezifisch bindendes System gehandelt haben kann, welches anscheinend das spezifisch bindende System völlig überdeckt hat.

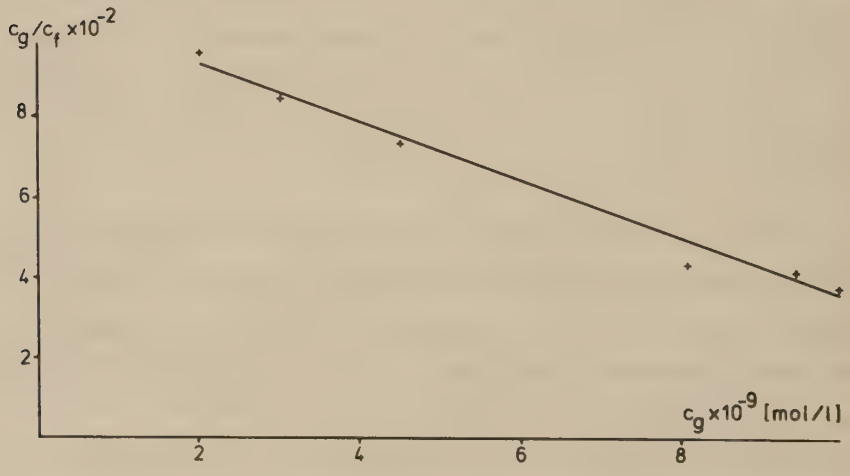


Abb.34a. Titration des "supernatant" mit hohen H3-EST-Konzentrationen [Adsorptionsmethode (Gl. 5)]

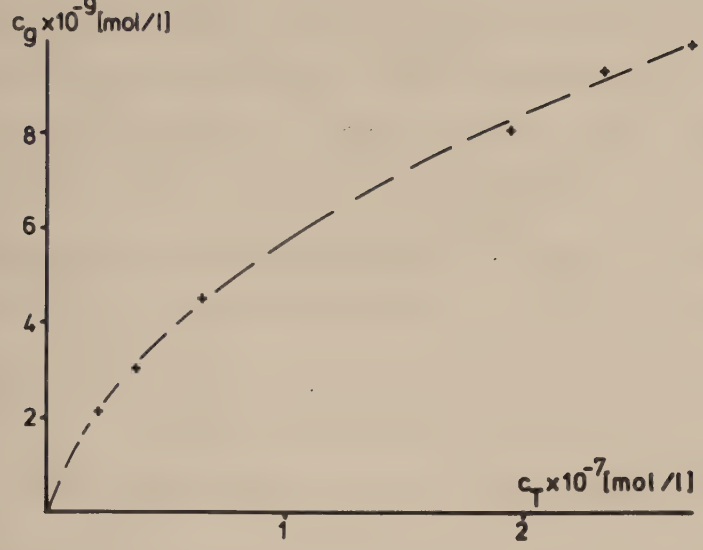


Abb.34b. Titration des "supernatant" mit hoher H3-EST-Konzentration; es wird keine Sättigung des Systems erreicht (Gl.5).

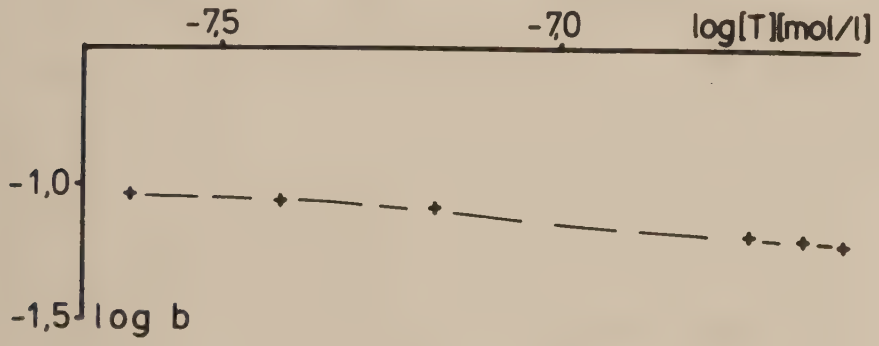


Abb.34c. Darstellung der Meßergebnisse von Gl.5 nach "proportion graph method"

Aus Abb.32 ist zu ersehen, daß dieser unspezifisch bindende Teil des "supernatant" erst ab einer Konzentration von ca. $2 \cdot 10^{-10}$

mol/l erfaßt wird. Zuvor wird das Hormon anscheinend nur von dem spezifisch bindenden System aufgenommen. Erst wenn dieses abgesättigt ist, kann überschüssiges Hormon an das unspezifisch bindende System gebunden werden. Inwieweit dieses System bereits schon bei den kleinen Konzentrationen von H3-EST miterfaßt wird, und die Titration beeinflußt, soll nun untersucht werden.
Hierfür wird die Titration des "supernatant" mit sehr kleinen Konzentrationen ($>2 \cdot 10^{-10}$ mol/l) an H3-EST durchgeführt. Die graphische Auswertung nach *Scatchard* [32] ergibt eine Gerade (Abb.35).
Die Bindungskonstanten (Tab.7) liegen in der Größenordnung, die für ein spezifisch bindendes System zugrunde gelegt wird.
Die graphische Auswertung nach "proportion graph method" zeigt nun auch eindeutig (Abb.35), daß bei dieser Titration in diesen niedrigen Konzentrationen von H3-EST nur das spezifisch bindende System erfaßt worden ist.

Tab.7. Bindungskonstanten von EST bei kleiner Konzentration mit "supernatant" (Adsorptionsmethode)

K_A (mol^{-1})	K_D (mol)	n (mol/g)
$2.66 \cdot 10^{9}$	$3.76 \cdot 10^{-10}$	$5.48 \cdot 10^{-11}$

In diesem Konzentrationsbereich hat demnach das unspezifisch bindende System des "supernatant" anscheinen keinen Einfluß bzw. wurde der Hormon-Komplex mit der Kohle zerstört. Allerdings ist es für jede Titration von großer Wichtigkeit, den Bereich zu kennen, in dem der störende Einfluß dieses unspezifisch bindenden Systems zum Tragen kommt. Dieses kann mit dem nun folgenden Versuch geklärt werden:

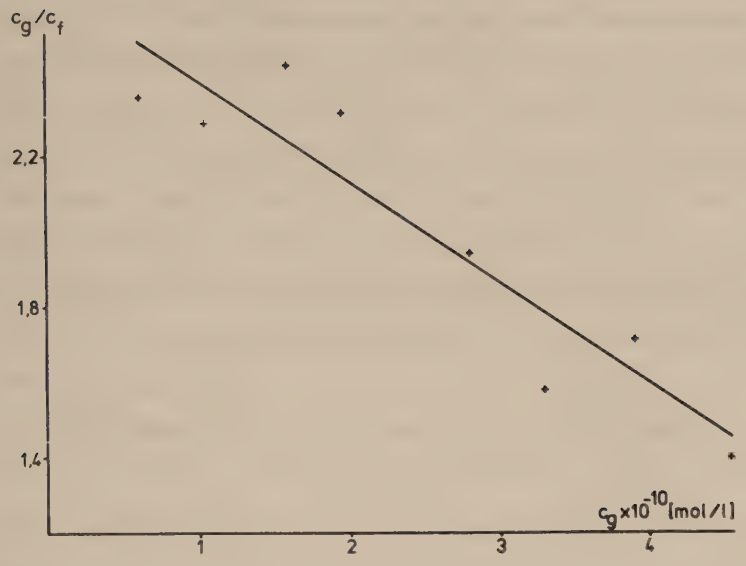


Abb.35a. Titration des "supernatant" mit geringer H3-EST-Konzentration; Darstellung nach *Scatchard* (Gl.6)

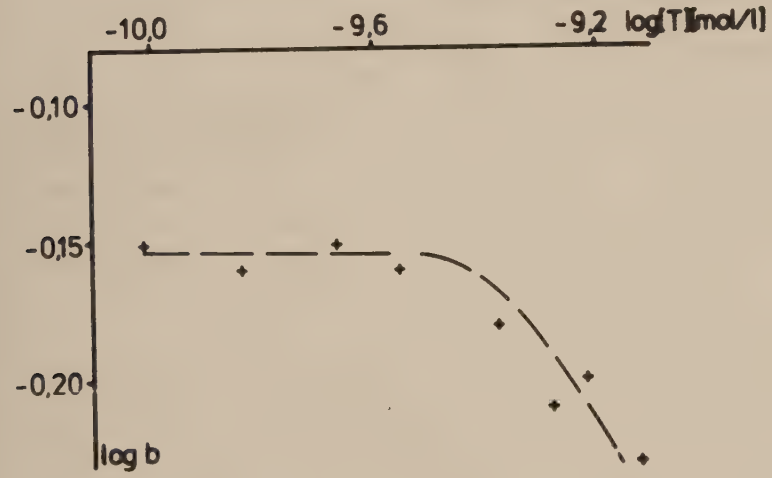


Abb.35b. Titration des "supernatant" mit geringer H3-EST-Konzentration; Darstellung nach "proportion graph method" (Gl.6)

Parallel zu einer Titration des "supernatant" mit H3-EST wird eine zweite Versuchsserie angesetzt. Hierfür wird jeder Probe aus der ersten Serie ein sehr großer Anteil an nichtmarkiertem EST (H-EST) zugefügt. Diese sehr hohe Konzentration an H-EST (Verhältnis 1:1000 - H3-EST : H-EST) [57] sollte das H3-EST nahezu vollständig aus seiner Bindung verdrängen können, das dann mit der Dextran-Kohle adsorbiert und abgeschleudert werden könnte. Dadurch würde die Zählrate dieser Probe sehr stark abfallen.
Sind jedoch unspezifische Bindungspartner im System, die auch bei den sehr hohen Konzentrationen an H-EST nicht abgesättigt werden können, so binden sie das von H-EST verdrängte H3-EST. Das Adsorptionsgemisch ist nun anscheinend nicht in der Lage, alle diese unspezifischen Bindungen zu zerstören, wie dieses im Versuch deutlich wird (Abb.36). Selbst bei sehr hoher H-EST-Konzentration kann noch ein gewisser Teil an H3-EST nach der Behandlung mit dem Adsorptionsgemisch gemessen werden.

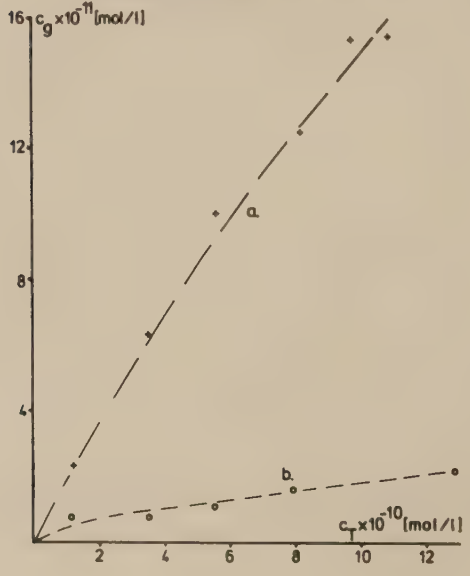


Abb.36. Titration des "supernatant" mit H3-EST und mit hoher Konzentration (10^{-6} mol/l) H-EST [Adsorptionsmethode (G1.7)]

Damit die Einflüsse dieser unspezifisch bindenden Systeme in den Versuchen beseitigt werden, sollen drei Bedingungen eingehalten werden:

1. Die Titration des "supernatant" muß in kleinen Konzentrationen erfolgen.
2. Der unspezifisch bindende Teil des Systems muß durch den Zusatz von sehr großen H-EST-Konzentrationen ermittelt werden. Die gefundenen Werte von c_g müssen dann um diesen Wert korrigiert werden.
3. Die Beeinflussung soll rechnerisch bestimmt werden.

12. Bestimmung der Bindungskonstanten mit der Dialysemethode

Die Konzentrationen an H3-EST, die für diese Versuche eingesetzt werden, sollen ebenfalls gering sein ($>2 \cdot 10^{-10}$ mol/l).
Es werden verschiedene Stammlösungen mit steigendem Hormongehalt hergestellt, mit denen die Dialysekammern gefüllt werden.
Eine Kammerhälfte wird mit dem "supernatant" gefüllt; in die andere Hälfte werden die Pufferlösungen mit den steigenden Hormonkonzentrationen gegeben.
Die Dialysezeit beträgt wieder 5 Stunden und wird jetzt bei $2^{o}C$ in der Kühlbox durchgeführt.
Nach Ablauf der Dialysezeit werden aus den beiden Kammerhälften jeweils Proben für die Messung der Zählrate entnommen.
Die Meßergebnisse werden korrigiert und graphisch nach *Scatchard* [32] aufgetragen (Abb.37). Dabei erhält man eine Gerade, aus der die

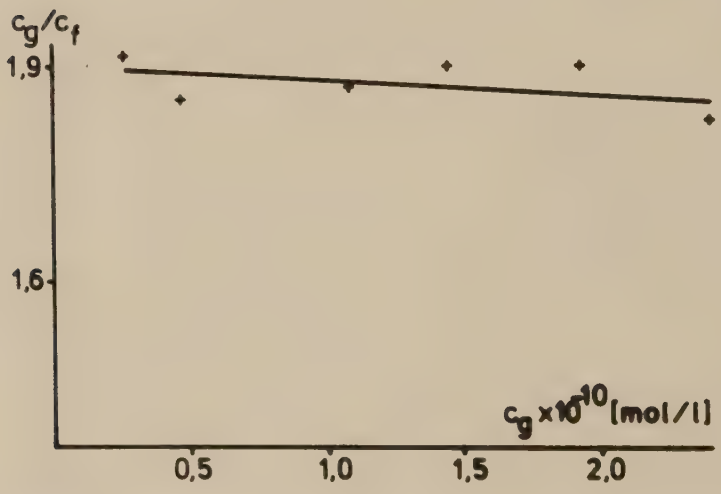


Abb.37. Titration des "supernatant" mit H3-EST [Dialysemethode (*Scatchard*)]

Bindungskonstanten berechnet werden (Tab.8). Diese Konstanten stimmen aber mit denen, die mit der Dextran-Kohle-Methode gefunden worden sind, nicht überein. Die Dissoziationskonstante liegt höher, und vor allem ist die Anzahl der Bindungsstellen groß. Das alles deutet darauf hin, daß das spezifisch bindende System nicht erfaßt worden ist, sondern es wurde wahrscheinlich wiederum durch das unspezifisch bindende System überlagert.

Tab.8. Bindungskonstanten von EST mit "supernatant" (Dialysemethode; Gl.12)

K_A (mol^{-1})	K_D (mol)	n (mol/g)
$2.31 \cdot 10^{8}$	$4.33 \cdot 10^{-9}$	$3.70 \cdot 10^{-10}$

Die graphische Darstellung nach "proportion graph method" verdeutlicht diese Annahme (Abb.38). Der Kurvenverlauf läßt auf ein unspezifisch bindendes System schließen.

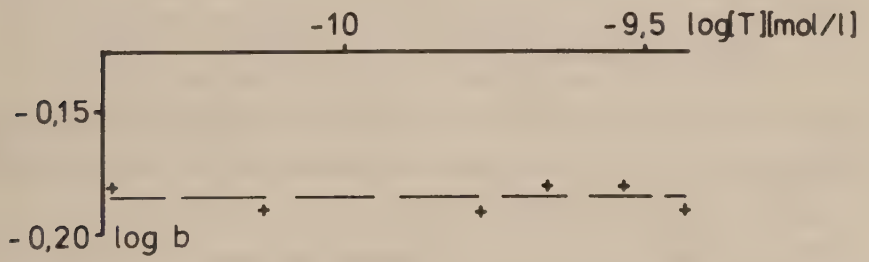


Abb.38. Titration des "supernatant" mit H3-EST mit der Dialysemethode ("proportion graph method")

Endgültigen Aufschluß gibt der nächste Versuch. Wie zuvor bei den Adsorptionsversuchen wird den einzelnen Stammlösungen eine hohe Konzentration ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/l) an H-EST zugesetzt und erneut eine Titration mit dem "supernatant" durchgeführt.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt eindeutig, daß selbst bei großem Hormonzusatz kaum eine Verminderung des gebundenen Anteils an H3-EST zu verzeichnen ist, wie dieses in Gegenwart von nur einem spezifisch bindenden System zu erwarten gewesen wäre (Abb.39).

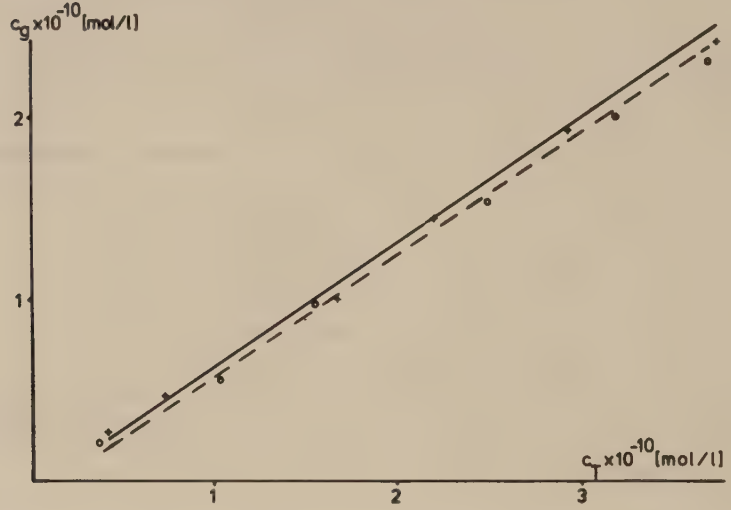


Abb.39. Titration des "supernatant" mit H3-EST und mit H3-EST + H-EST (Dialysemethode)

Das System bindet alles Hormon, was innerhalb der Löslichkeit von EST zugesetzt werden kann. Es ist innerhalb dieses Konzentrationsbereiches nicht abzusättigen.

Selbst bei Verwendung von sehr kleinen Konzentrationen an EST verdecken die unspezifisch bindenden Teile des Systems den spezifischen Cytosolrezeptor vollkommen; d.h. die Dialysemethode ist nich in der Lage, zwischen den verschiedenen Bindungssystemen zu trennen. Somit können mit ihr die Bindungskonstanten des "supernatant" nicht bestimmt werden, solange dieses in einer rohen Aufbereitung vorliegt, die noch zusätzlich andere Zellbestandteile enthält, die EST unspezifisch binden können.

Zur Durchführung der Dialysemethode wäre eine vorherige Reinigung des Rezeptors notwendig [61,62]. Da dieses aber für die momentane Aufgabenstellung zu aufwendig ist, soll im Augenblick auf die Dialysemethode verzichtet werden, und die weiteren Untersuchungen werden mit der zuvor beschriebenen Adsorptionsmethode durchgeführt.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die Affinität von Verbindungen zu untersuchen:

1. Es werden die Bindungskonstanten der Verbindungen einzeln bestimmt, die dann miteinander verglichen werden können. Hierzu ist es allerdings erforderlich, daß alle diese Substanzen in radioaktiv markierter Form vorliegen.
   Dieses wäre aber zu aufwendig und zu teuer; deshalb bedient man sich meistens der zweiten Methode [25,46]:
2. Die Methode der kompetitiven Rezeptorbindung. Mit dieser Methode ist man nur auf eine radiokativ markierte Substanz angewiesen. Der Anteil dieser an den Rezeptor gebundenen Bezugssubstanz kann von der Testsubstanz herabgesetzt werden, für den Fall, daß die eingesetzte Testsubstanz eine Affinität zum gleichen Rezeptor hat (Abb.40). Gemessen werden kann die Verminderung des an den Rezeptor gebundenen Anteils der Bezugssubstanz. Diese Verminderung der Bindung kann vergleichsweise eine Aussage über die Bindungskraft der einzelnen Testsubstanzen geben.

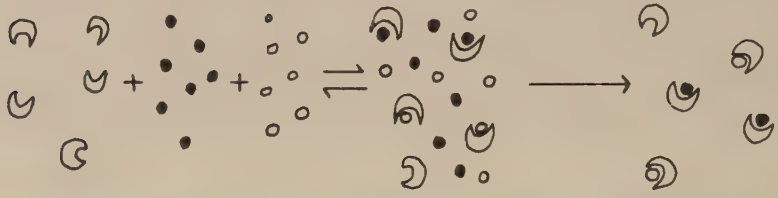


Abb.40. Schematische Darstellung der kompetitiven Messung der Rezeptorbindung (nach *Lübke* [1])

13. Verdrängungsanalyse mit Diethylstilböstrolanalogen

Wie eingangs erwähnt, wird nicht nur EST spezifisch an den Cytosolrezeptor gebunden. Auch DES wird mit einer vergleichbaren Affinität vom Rezeptor aufgenommen.

In Abb.41 ist zu erkennen, daß EST und DES annähernd gleich gut H3-EST verdrängen. Hierfür wurden konstante Konzentrationen an H-EST bzw. H3-EST, steigende Konzentrationen H3-EST zugesetzt. Die Verminderung des gebundenen Anteils c_g an H3-EST ist ein Maß für die Affinität der Substanz, die H3-EST aus seiner Rezeptorbindung verdrängt. Somit verläuft die Kurve flacher, die man erhält, wenn man c_g (aus H3-EST + H-EST bzw. H-DES) gegen c_f aufträgt (Abb.41).

Um die Frage nach Strukturen, die spezifisch vom Cytosolrezeptor gebunden werden, beantworten zu können, soll versucht werden, den Grundkörper des DES systematisch aufzubauen und zu verändern. Dabei sollen sowohl die Änderung des Abstandes der beiden OH-Gruppen zueinander, wie auch die Abwandlung der Struktur von DES in Abhängigkeit zur Bindungsaffinität untersucht werden.

Die erste der Verbindungen (Tab.8; Abb.43) - Octandiol - weist zwei OH-Gruppen auf, die im vergleichbaren Abstand zu denen im DES stehen. Ansonsten ist keine Ähnlichkeit zur Struktur von DES vorhanden. Die Verdrängung dieser Substanz ist auch gering (Tab. 9).

In den folgenden Verbindungen ist die Grundstruktur von DES bereits vorgegeben, beide OH-Gruppen sind an jeweils einen Aromaten gebunden. Variiert wird der Abstand der beiden OH-Gruppen und die Struktur zwischen den beiden Aromaten. Dadurch kommt es zu einer Änderung der räumlichen Anordnung der beiden Aromaten zueinander.

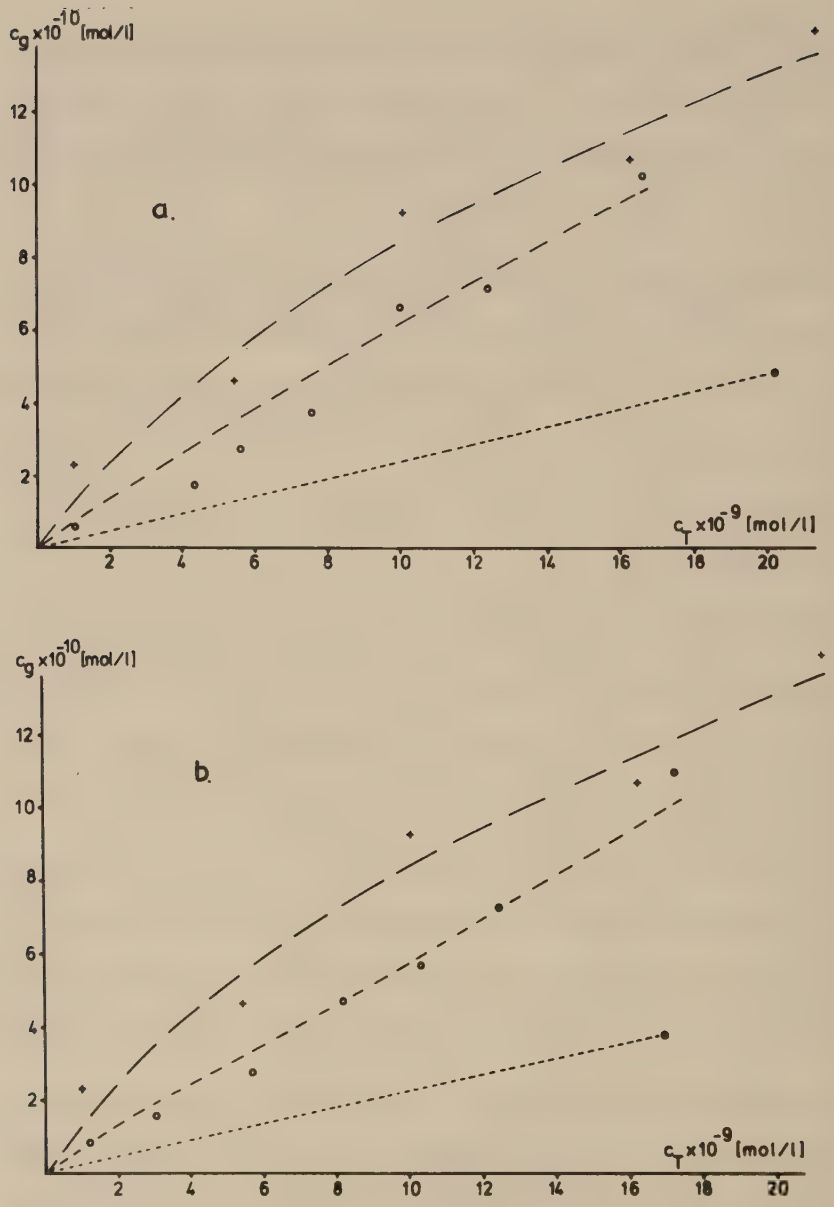


Abb.41. a) Verdrängungsanalyse von H3-EST mit H-EST (– – – 4.9 ·10 mol/l; --- 8.8·10 mol/l); b) Verdrängungsanalyse von H3-EST mit H-DES (– – – 4.9·10 mol/l; --- 8.8·10 mol/l)

Betrachtet werden soll die Veränderung des Winkels, den beide Aromaten miteinander bilden (Abb.42).

Tab.8. Verzeichnis der Testsubstanzen

A 1 :	Octan-1,8-diol
A 2 :	Biphenyl-4,4'-diol
A 3 :	Bis(4-hydroxyphenyl)methan
A 4 :	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)butan
A 5 :	Stilben-4,4'-diol
A 6 :	Stilben-4,4'-diacetat
A 7 :	Dimethylstilben-4,4'-diol
A 8 :	Diethylstilben-4,4'-diol (Diethylstilböstrol)
A 9 :	3,3-Bis(4-hydroxyphenyl)hexan (Hexöstrol)
A 10:	3,4-Bis(4-hydroxyphenyl)hexa-2,4-dien (Dienöstrol)
A 11:	1,3,5(10)-Estratrien-3,17-diol (Östradiol)
A 12:	4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,6-dimethylcyclohex-4-en-1,2-dicarbonsäureanhydrid
A 13:	4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,6-dimethylcyclohex-4-en-1,2-dicarbonsäuredimethylester
A 14:	4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,6-dimethylcyclohex-4-en-1,2-dicarbonsäurediethylester
A 15:	4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,6-dimethylcyclohex-4-en-1,2-dicarbonsäuredibutylester
A 16:	4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,6-dimethylcyclohex-4-en-1,2-dicarbonsäureimid
A 17:	5,8-Dimethyl-6,7-(4-hydroxyphenyl)-1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahydrophthalazin-1,4-dion
A 18:	4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,6-dimethylcyclohex-4-en-1,2-dinitril

Mit Biphenyldiol (A 2) ist der kürzeste Abstand der beiden paraständigen phenolischen OH-Gruppen gegeben. Die Bindung zum Rezeptor steigt gegenüber A 1 an.

Der Abstand der OH-Gruppen ist in der Substanz A 3 vergrößert worden. Zwischen beide Aromaten ist eine $-CH_2$-Gruppe eingeführt wor-

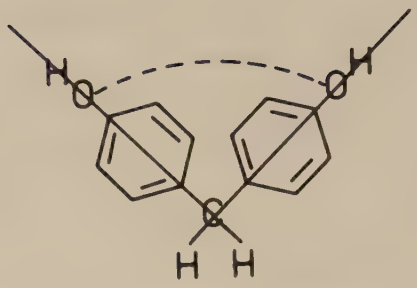


Abb.42. Darstellung des Winkels zwischen den Aromaten (schematisch)

den. Dadurch wird das Molekül angewinkelt. Somit kann der Abstand der OH-Gruppen voneinander nicht vergrößert werden; er wird verkleinert.

Die Rezeptorbindung läßt gegenüber A 2 nach.

A 4 hat den gleichen Aufbau wie A 3. Die Winkelung der beiden Aromaten und der Abstand der OH-Gruppen haben sich nicht verändert. Hinzugekommen sind eine CH_3- bzw. eine C_2H_5-Gruppierung, die abgewinkelt zu den Aromatenebenen stehen. Durch diese Änderung allein kommt es zu einer Verbesserung der Verdrängungsrate um 16% gegenüber A 3.

Mit Stilbendiol (A 5) wird die Bindung an den Rezeptor weiter gesteigert. Allerdings erreicht die Verbindung, da die beiden C_2H_5-Gruppen fehlen, noch nicht die gleiche Affinität wie DES. Wird anstelle des Stilbendiols das Diacetat des Stilbendiols eingesetzt, sinkt die Affinität dieser Verbindung stark ab. Dieses verdeutlicht hier die Wichtigkeit der phenolischen OH-Gruppen.

Die Verdrängungsrate kann von Dimethylstlböstrol nach Diethylstilböstrol auf 92% gesteigert werden und ist damit mit der von Östradiol (A 11) - 91.5% - vergleichbar.

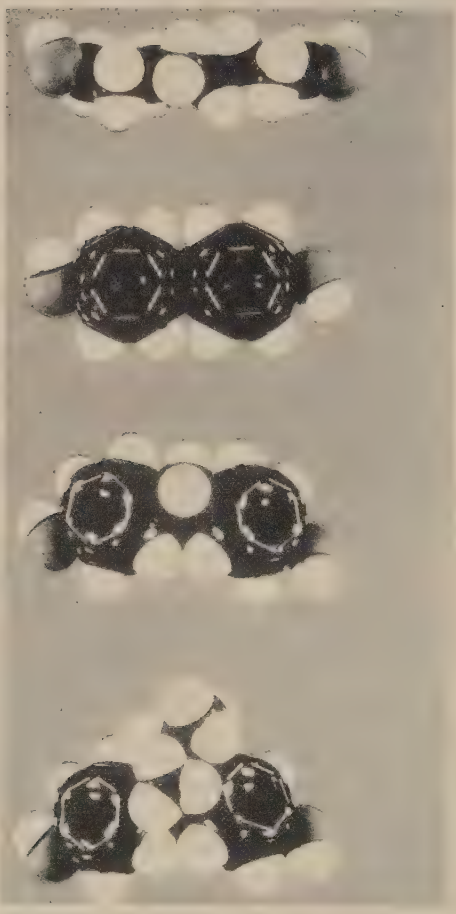
Tab.9. Verdrängungsrate der Testsubstanzen

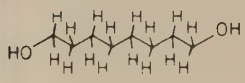
Testsubstanz (100 nM)	Verdrängtes H3-EST (%)
A 1	12.0
A 2	44.9
A 3	25.7
A 4	41.7
A 5	59.1
A 6	9.9
A 7	66.8
A 8	92.0
A 9	84.8
A 10	65.2
A 11	91.5

Betrachtet man die Unterschiede am Molekül (Abb.43), die zu diesem Ergebnis geführt haben, so kann man zuerst erkennen, daß sich der Abstand der OH-Gruppen von A 5, A 7 und A 8 nicht verändert hat. Auch bleibt der Winkel der Aromaten zueinander erhalten. Verändert hat sich der Aufbau zwischen den beiden Aromaten. Bereits durch die Einführung der Methylgruppen in A 7 steigert sich die Bindungsaffinität. Werden diese Seitenketten verlängert, so daß die CH_3-Gruppe in einem größeren Abstand zur Aromatenebene kommt (A 8), so erreicht die Bindungsaffinität den größten Wert. Ähnliches wurde bereits bei A 3 und A 4 beobachtet. Auch hier wurde allein mit der Einführung einer CH_3- und einer C_2H_5-Gruppe die Bindungseigenschaft verbessert.

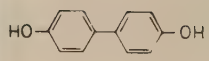
Die Rezeptorbindungen von Hexöstrol und Dienöstrol fallen gegenüber DES wieder ab. Evtl. kann dieses darauf zurückgeführt werden, daß beide Moleküle durch die Änderung der Bindungslängen zwischen den Aromaten wiederum stärker angewinkelt werden.

In dieser Serie zeichnet sich ab, daß anscheinend nicht nur der

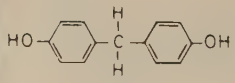




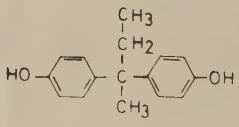
A1



A 2

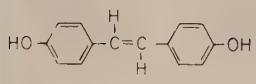


A 3

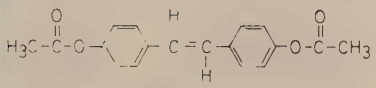


A 4

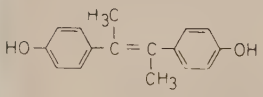
Abb.43a. Testsubstanzen für die Verdrängungsanalyse (s.Tab.8)



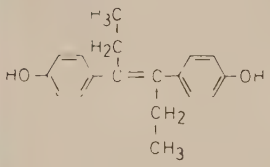
A 5



A 6

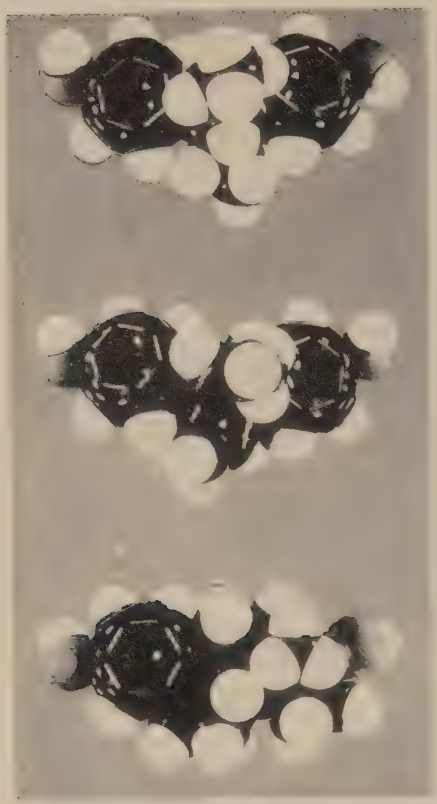


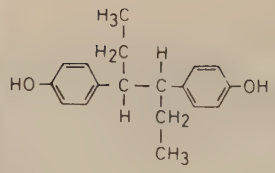
A 7



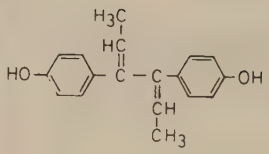
A 8

Abb.43b. Testsubstanzen für die Verdrängungsanalyse (s.Tab.8)

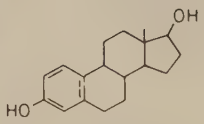




A 9



A 10



A 11

Abb.43c. Testsubstanzen für die Verdrängungsanalyse (s.Tab.8)

Abstand der beiden OH-Gruppen voneinander entscheidend für die Rezeptorbindung ist, sondern es können zwei weitere Merkmale erkannt werden. Zum einen ist die Bindung abhängig von dem Winkel, den die beiden Aromaten mit den OH-Gruppen zueinander bilden. Zum anderen ist eine aliphatische Gruppierung, die aus der Aromatenebene herausstehen muß, von Wichtigkeit.

Vergleicht man diese Strukturmerkmale mit EST, so kann man diesen

Aufbau am Molekül wiedererkennen. Beide Ringe, A und D, die mit den polaren Gruppen substituiert sind, stehen zueinander leicht gewinkelt. Eine CH_3-Gruppe steht ebenfalls aus dieser Ebene heraus, C 13.

In Tab.8 sind weitere Substanzen aufgeführt, die zusätzlich untersucht werden sollen. A 14, A 15, A 16 (Abb. 44b und 44c) und A 17 werden analog zu der Vorschrift für A 12 bzw. A 13 [66] (Abb. 44a) hergestellt. Diese beiden Substanzen zeigen in ersten Bindungsversuchen eine Affinität zum Cytosolrezeptor, wobei die Verdrängungsrate von A 13 mit der von EST vergleichbar ist.

Daher sollen auch die Verbindungen untersucht werden, die analog zu A 13 synthetisiert worden sind. Die Ergebnisse der Verdrändungsanalyse der aus den Synthesen isolierten Substanzen sind in Tab.10 aufgeführt.

Diese Verbindungen scheinen wenig strukturelle Ähnlichkeiten mit EST oder DES zu haben. Beide phenolischen OH-Gruppen, die für die Rezeptorbindung essentiell sind, stehen sehr nahe zusammen. Der Winkel, den beide Aromaten zueinander bilden, ist sehr klein.

Trotzdem zeigen diese Verbindungen teilweise eine starke Affinität zu dem Rezeptor.

Tab.10. Verdrängunsrate der Testsubstanzen

Testsubstanz (100 nM)	Verdrängtes H3-EST (%)
A 12	50.2
A 13	89.9
A 14	45.9
A 15	66.7
A 16	49.7
A 17	89.7
A 18	77.5

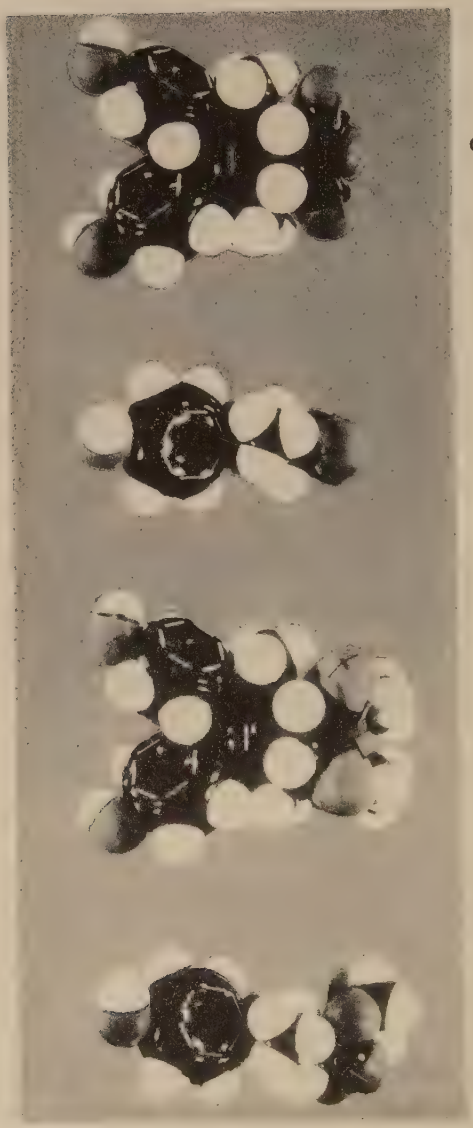
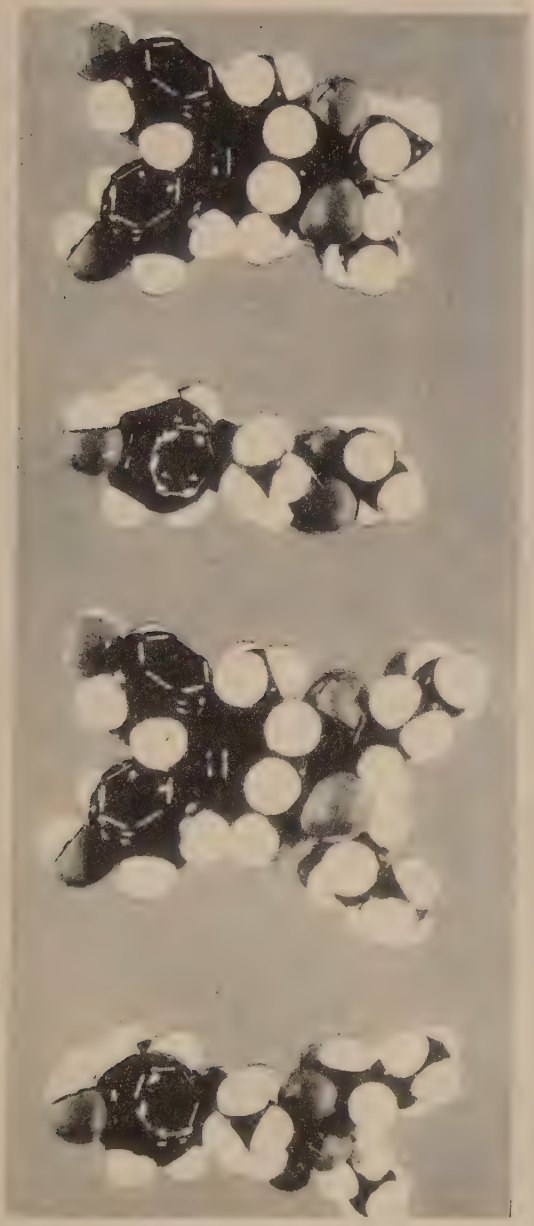
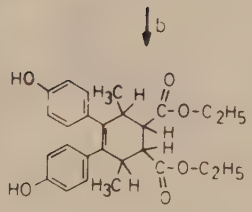


Abb.44a. Testsubstanzen für die Verdrängungsanalyse (s.Tab.8)



a

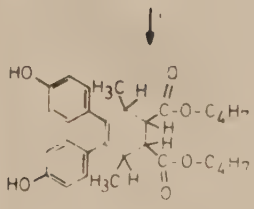
b



A 14

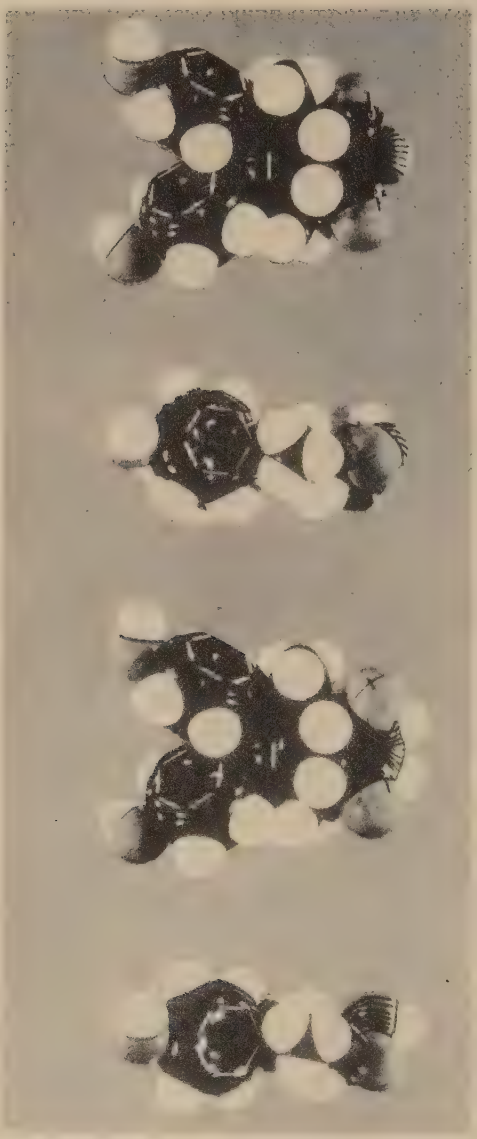
a

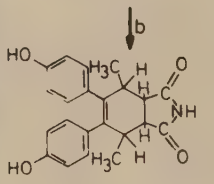
b



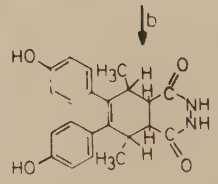
A 15

Abb.44b. Mögliche Analoge zu A 13 (s.Tab.8)





A16



A17

Abb.44c. Mögliche Analoge zu A 13 (s.Tab.8)

Betrachtet man die Überseite (b) der Moleküle, so werden hier zum Teil wieder Strukturmerkmale erkennbar, die mit denen von EST zu vergleichen sind.

Zwei polare Gruppierungen (OH-Gruppe und O=C-O-Gruppe sind über den Aromaten und den Cyclohexenring zueinander gewinkelt angeordnet. Aus dieser Ebene steht wiederum eine CH_3-Gruppe heraus, die in ihrer Stellung mit der CH_3-Gruppe am C-13 von EST vergleichbar ist.

Verändert man die Struktur am C-1 - A 13 zu A 12 - so läßt die Rezeptorbindung nach. Dieses bestärkt die Vermutung, daß die Bindung nicht über die beiden phenolischen OH-Gruppen erfolgt, sondern über eine phenolische OH-Gruppe, die CH_3-Gruppe und die Ester-Gruppe.

Auffallend ist die Rezeptorbindung von A 18 (Abb.45). Obwohl die OH-Gruppen blockiert sind, kommt es zu keiner vergleichbaren Abschwächung der Bindung, wie dieses bei A 6 der Fall gewesen ist.

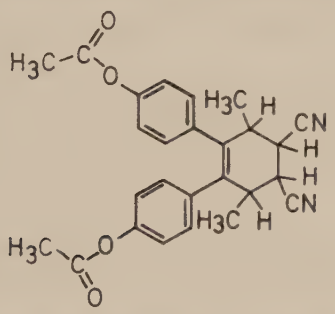


Abb.45. 4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,4-dimethylcyclohex-4-en-1,2-dinitril (A 18)

Die Bindungsergebnisse der möglichen Addukte von A 14, A 15, A 16 und A 17 müssen im einzelnen noch exakter untersucht werden. Dabei soll vor allem darauf geachtet werden, welche Veränderungen am Mo-

lekül zu einer Verstärkung bzw. Abschwächung der Rezeptorbindung führen wird.

14. VERGLEICHENDE BERECHNUNGEN DER BINDUNGSKONSTANTEN

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Bindungskonstanten nach der Methode von *Scatchard* [32] berechnet, der die Beziehung

$$c_g/c_f = n \cdot K \cdot [p] - K \cdot c_g \qquad (1)$$

$$c_g/c_f = f\ (c_g)$$

c_g = gebundener Anteil
c_f = freier Anteil
$[p]$ = Proteinkonzentration
n = Bindungsstellen
K = Bindungskonstante

zugrunde liegt.

Besteht der bindende Teil aus einem Bindungssystem mit gleichen Bindungsstellen, so ergeben die Meßwerte der Analyse bei Auftragung von c_g/c_f gegen c_g eine Gerade (Abb.10). Die Bindungskonstanten K_A und n lassen sich aus den Ordinatenabschnitten ermitteln.

Allerdings ist es nicht immer möglich, die erhaltenen Meßwerte einer Bindungsanalyse, Titration, zu einer Geraden zu verbinden. Wie aus Abb.32 ersichtlich ist, ergeben sie eine durchgebogene Kurve, die assymptotisch zu zwei Geraden mit unterschiedlichen Steigungen verläuft.

Die Konstanten dieser beiden Geraden lassen sich nicht mehr aus Gleichung 1 bestimmen. Hierfür wird diese in

$$c_g/c_f = \frac{n_1 \cdot K_1 \cdot [p]}{1 + K_1 \cdot c_f} + \frac{n_2 \cdot K_2 \cdot [p]}{1 + K_2 \cdot c_f} \qquad (2)$$

erweitert. Mit dieser Gleichung ist man in der Lage, Bindungssysteme, die zwei verschiedene Bindungspartner enthalten, zu berechnen.

Nach *Rosenthal* [63] wird dazu c_g/c_f gegen c_g aufgetragen und die beiden Geraden

$$c_g/c_f = K_1 \cdot n_1 \cdot [p] - K_1 \cdot c_g$$

und

$$c_g/c_f = K_2 \cdot n_2 \cdot [p] - K_2 \cdot c_g$$

graphisch ermittelt.

Die Bindungskonstanten sollen nun mit Hilfe eines Rechenprogramms auf der Grundlage von Gleichung 2 berechnet werden. Hierzu werden die Gleichungen 1 und 2 in

$$c_g/[p] = \frac{n \cdot K \cdot c_f}{1 + K \cdot c_f} \qquad (3)$$

und

$$c_g/[p] = \frac{n_1 \cdot K_1 \cdot c_f}{1 + K_1 \cdot c_f} + \frac{n_2 \cdot K_2 \cdot c_f}{1 + K_2 \cdot c_f} \qquad (4)$$

umgeformt. Für diese Gleichungen 3 und 4 gilt (Abb.46):

$$c_g = f\ (c_f)$$

Die Gleichungen 3 und 4 sind jetzt identisch mit denen, die *Baulieu* [39] für die Berechnungen der Bindungskonstanten zugrunde legt.

Gleichung 3 berechnet die Konstanten für ein spezifisch bindendes System. Mit Gleichung 4 können diese für zwei spezifisch bindende Systeme bestimmt werden.

Während *Baulieu* die Bindungskonstanten aus der logarithmischen Darstellung bestimmt,

$$\lg \frac{c_g}{c_g + c_f} = f\ (\log\ (c_g + c_f))$$

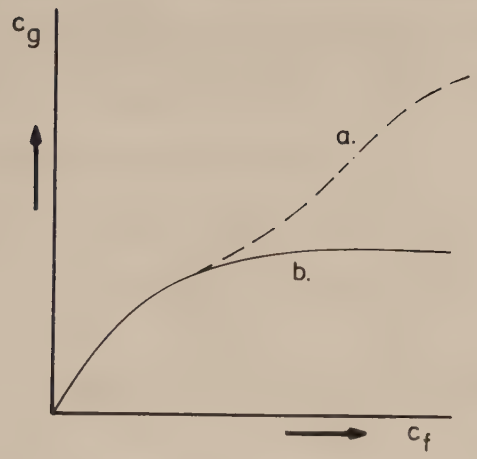


Abb.46. Graphische Darstellung von Gleichung 3 und 4 $c_g = f(c_f)$; a. 2 Bindungssysteme; b. 1 Bindungssystem

soll im folgenden nach Gleichung 3 und 4 in der Darstellung

$$c_g = f\ (c_f)$$

gearbeitet werden.

Die somit erhaltenen Konstanten werden mit denen, die mit der Methode nach *Scatchard* [32] erhalten worden sind, anhand der Summe der Fehlerquadrate (SFQ) verglichen.

Mit Gleichung 4 wird zusätzlich überprüft, ob sich evtl. ein zweites bindendes System nachweisen läßt. Es wird dabei nicht unterschieden, ob es sich dabei um ein spezifisch bindendes oder nichtspezifisch bindendes System handelt. Es soll lediglich eine Aussage darüber getroffen werden, ob es mit den versuchstechnischen Änderungen (s.S.64) gelungen ist, mit den Titrationen nur ein bindendes System zu erfassen.

Für den Versuch GL4 (s.S. 59) können nun mit Gleichung 4 die Kon-

stanten berechnet werden (Tab.11; Abb.47).

Die auf Seite 60 aufgeführten Konstanten wurden aus den beiden Assymptoten zur Bindungsgerade berechnet. Sie unterscheiden sich deutlich von denen, die mit Gleichung 4 erhalten werden.

Tab.11. Bindungskonstanten des Versuchs GL4 berechnet mit Gleichung 4

	K_A (mol^{-1})	K_D (mol)	n (mol/g)
1. Bindung	$3.86 \cdot 10^{11}$	$2.59 \cdot 10^{-12}$	$2.58 \cdot 10^{-12}$
2. Bindung	$1.70 \cdot 10^{6}$	$5.88 \cdot 10^{-7}$	$1.55 \cdot 10^{-9}$

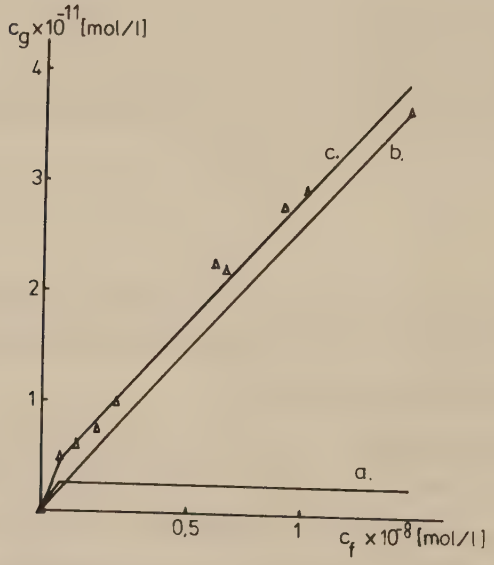


Abb.47. Darstellung des Versuchs GL4 nach $c_g = f(c_f)$ mit Gleichung 4: a= 1. Bindung, b= 2. Bindung, c= Summe von 1. und 2. Bindung

Es können innerhalb des Meßbereiches des Versuches zwei Bindungen

berechnet werden. Die erste Bindung kann aufgrund der Bindungskonstanten als das spezifisch bindende System angesehen werden, welches bereits bei niedrigen Hormonkonzentrationen abgesättigt ist.

Die Bindungskonstanten der zweiten Bindung weisen auf ein unspezifisch bindendes System hin (vgl. Bindungskonstanten von EST mit Albumin).

In Versuch Gl5 wurde der Titration des "supernatant" mit hoher Hormonkonzentration durchgeführt. Auch hier kann mit Gleichung 4 ein zweites bindendes System innerhalb des Meßbereichs ermittelt werden (Tab.12), welches aufgrund der Konstanten als das spezifisch bindende System bezeichnet werden kann. Allerdings ist der Einfluß dieses Systems auf die Bindung des zweiten unspezifisch bindenden Systems sehr viel geringer geworden, da es mit der hohen Hormonkonzentration schnell abgesättigt ist (Abb. 48; Tab.12).

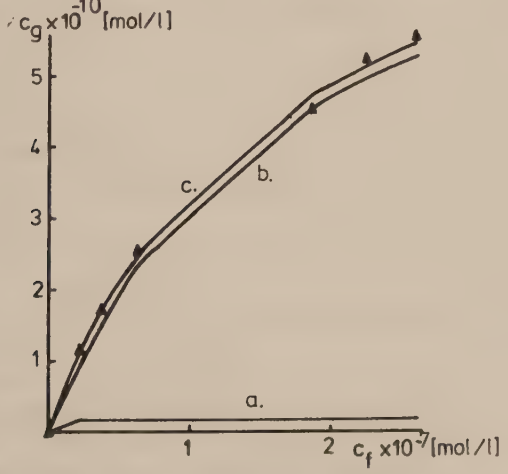


Abb.48. Darstellung des Versuchs GL5 nach $c_g = f(c_f)$ nach Gleichung 4: a= 1.Bindung, b= 2.Bindung, c= Summe von 1. und 2.Bindung

In Tab.12 ist zu sehen, daß die SFQ für die Berechnungen der Bindungskonstanten von GL5 nach Gleichung 4 (SIMPRO) deutlich verbessert ist gegenüber der Berechnung nach Gleichung 3 und Gleichung 1, mit denen nur ein bindendes System ermittelt werden kann. Das bedeutet, daß sich die Meßwerte aus GL5 sehr viel besser mit Gleichung 4, die daraus zwei Bindungssysteme berechnet, darstellen lassen.

Mit Versuch GL6 ist es gelungen, bei der Titration des "supernatant" mit tiefen Hormonkonzentrationen den Einfluß des unspezifisch bindenden Systems zu beseitigen (Abb.49).

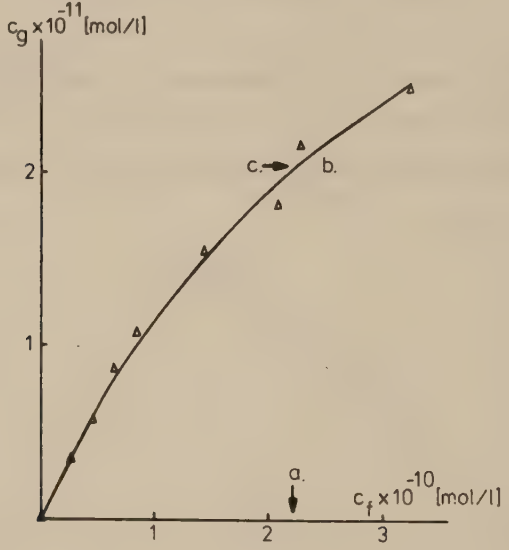


Abb.49. Darstellung des Versuchs GL6 nach $c_g = f(c_f)$ nach Gleichung 4: a= 1.Bindung, b) 2.Bindung, c= Summe von 1. und 2.Bindung

Auch hierbei wird die SFQ für die Berechnung der Bindungskonstanten nach Gleichung 4 (Tab.12) deutlich verbessert. Doch hat die

berechnete 1.Bindung so gut wie keinen Einfluß auf die 2.Bindung und liegt weit außerhalb des Meßbereiches. Dieses läßt darauf schließen, daß mit diesem Versuch nur das spezifisch bindende System erfaßt worden ist.

Die Tabelle 12 enthält alle Berechnungen der Bindungskonstanten nach *Scatchard* (SCATCH), nach Gleichung 3 (SIMFIM) und nach Gleichung 4 (SIMPRO). Versuche, die im allgemeinen Teil der Arbeit beschrieben worden sind, werden mit GL bezeichnet. Mit VV werden dazugehörige Parallelversuche gekennzeichnet.

Bemerkenswert für die Berechnung der Bindungskonstanten ist die deutliche Verbesserung der SFQ, die generell mit der Auswertung nach Gleichung 4 erhalten wird. Somit können die Konstanten mit dieser Gleichung genauer ermittelt werden, als dieses mit der Methode nach *Scatchard* der Fall ist. Bereits mit Gleichung 3 kann meist eine Verbesserung der SFQ in der Auswertung gegenüber *Scatchard* erreicht werden. Doch scheint die Darstellung der Meßergebnisse mit Gleichung 4, die zwei Bindungssysteme zugrunde legt, sehr viel genauer zu sein. Mit dieser Gleichung werden auch stets vergleichbare Konstanten berechnet,und die Größenordnung der Konstanten des unspezifisch bindenden Anteils kann dem Serumalbumin und anderen Zellbestandteilen zugeordnet werden, die sich im "supernatant" noch befinden.

An dieser Stelle bliebe noch zu untersuchen, ob die mit Gleichung 4 berechneten 1.Bindungen aus GL6, GL7, GL12, VV2, VV4 und VV9 lediglich aufgrund der mathematischen Beziehungen in Gleichung 4 entstehen, oder ob es sich hierbei um ein zweites hoch spezifisch bindendes System handelt, welches mit der eingesetzten Hormonkonzentration bereits abgesättigt ist. Auffallend ist, daß die Konstanten dieser 1.Bindungen in einer vergleichbaren Größenordnung

($K_A = 1 \cdot 10^{15}$ mol^{-1}) liegen. Sie werden immer dann berechnet, sobald der Einfluß des unspezifisch bindenden Systems ($K_A = 1 \cdot 10^{6}$ mol^{-1}) ausgeschaltet worden ist.

Tab.12. Berechnung der Bindungskonstanten; GL= Versuche aus dem allgemeinen Teil; VV= Parallelversuche

	SCATCH			SIMFIM			SIMPRO		
Versuch	K_A (mol^{-1})	n (mol/g)	SFQ	K_A (mol^{-1})	n (mol/g)	SFQ	K_A (mol^{-1})	n (mol/g)	SFQ
GL4	-	-	-	-	-	-	1.Bindung: $3.86 \cdot 10^{11}$ 2.Bindung: $1.70 \cdot 10^{6}$	$2.58 \cdot 10^{-12}$ $1.55 \cdot 10^{-9}$	$3.91 \cdot 10^{-2}$
GL 5	$7.31 \cdot 10^{6}$	$8.22 \cdot 10^{-9}$	1.00	$7.40 \cdot 10^{6}$	$8.15 \cdot 10^{-10}$	1.00	1.Bindung: $5.60 \cdot 10^{10}$ 2.Bindung: $5.89 \cdot 10^{6}$	$1.79 \cdot 10^{-11}$ $8.67 \cdot 10^{-10}$	$2.94 \cdot 10^{-3}$
GL 6	$2.66 \cdot 10^{9}$	$5.48 \cdot 10^{-11}$	1.02	$3.35 \cdot 10^{9}$	$4.68 \cdot 10^{-11}$	0.74	1.Bindung: $1.43 \cdot 10^{15}$ 2.Bindung: $2.74 \cdot 10^{9}$	$7.00 \cdot 10^{-16}$ $5.34 \cdot 10^{-11}$	$2.22 \cdot 10^{-2}$
GL 7	$4.17 \cdot 10^{8}$	$3.19 \cdot 10^{-11}$	1.76	$4.47 \cdot 10^{8}$	$2.23 \cdot 10^{-11}$	1.01	1.Bindung: $5.63 \cdot 10^{15}$ 2.Bindung: $4.46 \cdot 10^{8}$	$1.77 \cdot 10^{-16}$ $2.23 \cdot 10^{-11}$	$1.40 \cdot 10^{-2}$
GL 9	$1.22 \cdot 10^{9}$	$8.80 \cdot 10^{-12}$	1.40	$1.43 \cdot 10^{9}$	$7.00 \cdot 10^{-12}$	1.27	1.Bindung: $1.18 \cdot 10^{12}$ 2.Bindung: $2.31 \cdot 10^{5}$	$8.51 \cdot 10^{-13}$ $1.28 \cdot 10^{-8}$	$1.49 \cdot 10^{-2}$
GL 12	$2.31 \cdot 10^{8}$	$3.70 \cdot 10^{-10}$	1.00	$2.69 \cdot 10^{8}$	$3.17 \cdot 10^{-10}$	1.00	1.Bindung: $1.89 \cdot 10^{15}$ 2.Bindung: $2.83 \cdot 10^{8}$	$5.28 \cdot 10^{-16}$ $3.02 \cdot 10^{-10}$	$2.33 \cdot 10^{-3}$
VV 1	-	-	-	$2.79 \cdot 10^{8}$	$3.26 \cdot 10^{-11}$	1.21	1.Bindung: $1.17 \cdot 10^{11}$ 2.Bindung: $4.16 \cdot 10^{4}$	$8.57 \cdot 10^{-12}$ $4.17 \cdot 10^{-8}$	$9.95 \cdot 10^{-2}$

Forts. Tab.12.

	SCATCH			SIMFIM			SIMPRO		
Versuch	K_A (mol^{-1})	n (mol/g)	SFQ	K_A (mol^{-1})	n (mol/g)	SFQ	K_A (mol^{-1})	n (mol/g)	SFQ
VV 2	$2.40 \cdot 10^{9}$	$1.44 \cdot 10^{-10}$	1.28	$2.94 \cdot 10^{9}$	$1.14 \cdot 10^{-11}$	$9.55 \cdot 10^{-1}$	1.Bindung: $3.63 \cdot 10^{14}$ 2.Bindung: $2.41 \cdot 10^{9}$	$2.75 \cdot 10^{-15}$ $1.23 \cdot 10^{-11}$	$1.08 \cdot 10^{-2}$
VV 3	$1.20 \cdot 10^{9}$	$1.54 \cdot 10^{-11}$	1.06	$1.43 \cdot 10^{9}$	$1.42 \cdot 10^{-11}$	1.05	1.Bindung: $4.99 \cdot 10^{14}$ 2.Bindung: $1.43 \cdot 10^{9}$	$2.00 \cdot 10^{-15}$ $1.42 \cdot 10^{-11}$	$4.9 \cdot 10^{-2}$
VV 4	$2.29 \cdot 10^{9}$	$7.04 \cdot 10^{-11}$	2.21	$2.98 \cdot 10^{9}$	$4.40 \cdot 10^{-11}$	$8.62 \cdot 10^{-1}$	1.Bindung: $5.23 \cdot 10^{14}$ 2.Bindung: $2.59 \cdot 10^{9}$	$1.91 \cdot 10^{-15}$ $4.85 \cdot 10^{-11}$	$1.0 \cdot 10^{-1}$
VV 9	$2.67 \cdot 10^{9}$	$6.82 \cdot 10^{-11}$	1.53	$3.35 \cdot 10^{9}$	$4.68 \cdot 10^{-11}$	$7.42 \cdot 10^{-1}$	1.Bindung: $1.13 \cdot 10^{15}$ 2.Bindung: $2.74 \cdot 10^{9}$	$8.80 \cdot 10^{-16}$ $5.34 \cdot 10^{-11}$	$2.22 \cdot 10^{-2}$

15. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Methodik der Bindungsanalyse von Diethylstilböstrol und Analoga.

Aus den verschiedenen Methoden werden zwei Verfahren ausgewählt:

a. Die "proportion graph method", mit der graphisch ermittelt wird, welche(s) bindende System(e) der Bindungsanalyse zugrunde liegen.

b. Die Methode nach *Scatchard*, mit der die Bindungskonstanten der Analysen zunächst berechnet werden.

Die wesentlichen Ergebnisse sind folgende:

1. Für die Bindungsanalyse an Albumin, ein unspezifisch bindendes System, kann die Dialysemethode nach *Scholtan* verbessert werden.
2. Die Analyse von Systemen mit verschiedenen bindenden Elementen kann nicht mit der Dialysemethode vorgenommen werden. Diese Analyse wird mit der Dextran-Kohle-Adsorptionsmethode durchgeführt.
3. Bei der Suche nach Strukturmerkmalen für die spezifische Rezeptorbindung wird festgestellt, daß für diese Bindung notwendig sind:
   a. zwei polare Gruppen, die über ein Ringsystem in einem definierten Abstand und in einer definierten Winkelung zueinander stehen müssen,
   b. eine begrenzte Alkylgruppe, die aus der Molekülebene herausragen muß.
4. Die Bindungskonstanten werden nach *Scatchard* und einer nach *Scatchard* modifizierten Methode berechnet. Das Ergebnis zeigt, daß die Bindungskonstanten mit der modifizierten Methode genauer berechnet werden können.

16. Experimenteller Teil

16.1. Allgemeine Methoden

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Geräte benutzt:

1. Dünnschichtscanner II LB 2723 (Fa. Berthold/Frieseke, Karlsruhe Durlach)
   Registrierung mit Kompensograph IV L (Fa. Siemens, Karlsruhe)
2. Linströmblock zur Bestimmung der Schmelzpunkte; sie sind nicht korrigiert
3. PMQ 3 (Fa. Zeiss, Oberkochem) für UV-spektroskopische Untersuchungen
4. Flüssigkeitsszintillationszähler Corumatic 200 (Fa. Kelm, Köln)
5. Ultrazentrifuge Typ 6100 (Fa. Heraeus Christ, Osterode)
6. Rotor W 65/40 Ti 12 x 12 ml (Fa. Heraeus Christ, Osterode)
7. Labofuge Typ 5413 (Fa. Eppendorf,
8. Kryostat Haake K + Haake F 3 (Fa. Haake, Karlsruhe)
9. Ultraturax Typ 45 (Fa. Janke und Kunkel, Staufen)
10. pH-Meter 644-1 (Fa. Knick, Berlin)
11. Brutschrank Typ KT 500 (Fa. Heraeus Christ, Hanau)
12. Rechner pdp-11/10 (Fa. "digital equipment c., maynard-massachusetts")

16.2. Radioaktiv markierte Hilfsstoffe, Puffer, Reagenzien, Membranen

1. (4-^{14}C)Östradiol (50 mCi/mmol) = (C14-EST)
   (Monoethyl-1-^{14}C)Diethylstilböstrol (50-100 mCi/mmol) = (C14-DES)
   (6,7-^{3}H)Östradiol (50 mCi/mmol) = (H3-EST)

(2,4,6,7-^{3}H)Östradiol (85 Ci/mmol) = (H3-EST)

Alle radioaktiv markierten Substanzen sind von Fa. Amersham, Braunschweig.

Die jeweiligen spezifischen Aktivitäten sind den Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Die radioaktiv markierten Substanzen werden in einem Lösungsmittelgemisch aus Toluol/Ethanol (9:1) geliefert. Das Lösungsmittel wird bei 40°C mit einem Stickstoffstrom abgeblasen; danach werden die Proben wiederum mit Methanol aufgenommen, bevor diese mit der Pufferlösung verdünnt werden.

2. Pufferzusammensetzung:

Phosphat: 18.2 ml 1/15 m Kaliumdihydrogenphosphat + 81.8 ml 1/15 m Dinatriumhydrogenphosphat

Imidazol: 13.6 ml 0.1N HCl + 25.0 ml 0.2 m Imidazollösung + 61.4 ml Wasser

Barbital: 41.8 ml 0.1 m Veronal-Na + 58.2 ml 0.1N HCl

Tris-EDTA: 1.579 g Tris HCl (10 mM) + 0.5584 g Na-EDTA (1.5 mM) + 1.082 g Monothioglycerol (10 mM) werden in 1000.0 ml Wasser gelöst

Tris-$MgCl_2$-KCl: 4.84 g Tris HCl (0.04 M) + 0.203 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.001 M) + 7.456 g KCl (0.1 M) werden in 1000.0 ml Wasser gelöst

Albumin: Human-Albumin 20% (Fa.Behringwerke, Marburg)

Sucrose: Saccharose (Fa. Serva, Heidelberg)

Dextran: Dextran T 500 (Fa. Serva, Heidelberg)

Alle Puffer werden mit NaOH bzw. HCl auf den pH-Wert: 7.4 eingestellt.

3. Rinderalbumin (Fa. Serva, Heidelberg)

4. Szintillator: Miniria 20 (Fa. Zinsser, Frankfurt)

5. Dextran-Kohle-Gemisch: 500 mg Dextran T 500 + 2.5 g Norit A (Fa. Serva, Heidelberg) werden in 250 ml Puffer 20 Stunden gerührt. Danach wird über eine Zentrifuge (ca. 10.000 U/min) gewaschen und mit Puffer auf 1000.0 ml aufgefüllt

6. *Lowry*-Bestimmung: 1. Lösung: 0.1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ werden in 20.0 ml 1% K-Na-Tartratlösung gelöst

2. Lösung: 2 g Na_2CO_3 werden in 100.0 ml 0.1N NaOH gelöst

3. Lösung: 1 ml der Lösung 1 + 50 ml Lösung 2

4. Lösung: Folin Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt) werden 1 : 2 mit Wasser verdünnt

1.0 ml Proteinlösung werden mit 5.0 ml Lösung 3 versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann werden 0.5 ml der Lösung 4 hinzugegeben und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird die Extinktion bei 723 nm gemessen.

7. Membranen: Millipore PSED (Fa. Millipore, Neu-Isenburg)
Millipore PTGC (Fa. Millipore, Neu-Isenburg)
"visking dialyse" (Fa. Block, Straßburg)
Cellophan Typ P 600 (Fa. Pütz, Taunusstein)
Polyamid SM 11905 (Fa. Sartorius, Göttingen)
reg. Cellulose SM 11539 (Fa. Sartorius, Göttingen)
Celluloseacetat SM 11733 (Fa. Sartorius, Göttingen)
Cellulosenitrat SM 12133 (Fa. Saetorius, Göttingen)

16.3. VERGLEICHSSUBSTANZEN

A 1 und A 2 (Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

A 3 (Fa. Ega, Steinheim)

A 4 (Fa. Aldrich, Beerse)

A 8 (Fa. Merck, Darmstadt)

A 9, A 10 und A 11 (Fa. Ferrak, Berlin)

Die Substanzen wurden durch DC, IR und NMR auf Identität und Reinheit überprüft.

A 14, A 15, A 16 und A 17 wurden analog zu A 13 [66] hergestellt. Die exakten Bezeichnungen der Verbindungen befinden sich in Tabelle 8.

Vorschriften zur Darstellung von A 14 bis A 17

A 14:

Eine Lösung von 1 g Dienöstrol und 12.0 ml Maleinsäurediethylester in 50 ml Xylol wird 20 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird die Lösung 5x mit je 40 ml verdünnter Natronlauge extrahiert. Die Extrakte werden mit Schwefelsäure auf pH-Wert= 4-5 gebracht und 4x mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die Lösung wird eingedampft und der erhaltene Feststoff aus Chloroform/Ethanol umkristallisiert.

Ausb.: 0.8 g (48.5%), Schmp.: 93-95°C

A 15:

Eine Lösung von 1 g Dienöstrol und 14 ml Maleinsäuredibutylester in 50 ml Xylol wird 20 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird 5x mit je 50 ml verdünnter Natronlauge extrahiert, mit Schwefelsäure auf pH= 4-5 angesäuert und 5x mit je 50 ml Diethylether

extrahiert. Der Ether wird am Rotationsverdampfer abgezogen, und man erhält ein braunes Öl. Durch Zugabe von Toluol erhält man einen braunen Feststoff, der aus Toluol/Ethanol sowie Hexan/Chloroform umkristallisiert wird.

Ausb.: 0.06 g (3.5%), Schmp.: 151-153°C

A 16:

Die Lösung von 1 g Dienöstrol und 7 g Maleinhydrazid in 80 ml Xylol wird 14 h unter Rückfluß erhitzt. Der ausgefallene Niederschlag wird zweimal aus Trichlorethylen/Hexan umkristallisiert und i.Vak. getrocknet.

Ausb.: 0.08 g (5.7%), Schmp.: 207-209°C

A 17:

Das Gemisch aus 0.7 g Dienöstrol, 4 g Maleinimid und 70 ml Xylol wird 6 h unter Rückfluß erhitzt und sofort (heiß) filtriert. Die danach ausfallenden Kristalle werden aus Toluol/Ethanol umkristallisiert.

Ausb.: 0.04 g (4.2%), Schmp.: 262-266°C

16.4. Messergebnisse und deren Berechnungen

Untersuchungen mit dem *Scholtan*'schen Dialysegerät

Adsorption von C14-EST an Kammer und Membran

1. Puffer: Phosphat-Puffer
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: 37°C
4. Dialysezeit: 5 Stunden

5. Drehzahl der Kammern: 40 U/min

6. EST-Konzentration: 1.0 ml C14-EST-Stammlösung + 1.0 ml Miniria 20 = 46.576 cpm

7. Probevolumen: 1. Kammerhälfte: 1.8 ml Phosphat-Puffer
2. Kammerhälfte: 1.8 ml Phosphat-Puffer + EST

8. Meßvolumen: 1.0 ml + 10.0 ml Miniria 20

Die Cellophanmembran ist für die Dialyse ca. 1 Stunde in der Pufferlösung gekocht worden, um Glycerin, welches als Stützsubstanz in der Membran enthalten ist, auszukochen.
Die Kammern werden mit einer Pipettiereinrichtung (Abb.50), die eine höhere Genauigkeit erlaubt, gefüllt.

Abb.50. Pipettiereinrichtung

Meßergebnisse

1. Kammerhälfte: 6.400 cpm/ml

2. Kammerhälfte: 6.528 cpm/ml

Es fehlen: 33.648 cpm/ml = 72.2%

Adsorption an die Dialysemembran

Die Membran wird in die C14-EST-Stammlösung eingelegt mit gleicher Konzentration wir zuvor:

1.0 ml der Lösung = 46.576 cpm

Meßergebnis

Konzentration an C14-EST nach 5 Stunden: 43.223 cpm/ml

Adsorption an die Kammer

Die Kammer wird mit gleicher C14-EST-Lösung wie zuvor gefüllt.

Meßergebnis

Konzentration an C14-EST nach 5 Stunden: 16.302 cpm/ml

Adsorption an die Cellophanmembran mit verschiedenen Puffern

Zu den verschiedenen Puffern werden gleiche Konzentrationen an C14-EST zugesetzt.

Meßergebnis (Meßvolumen: 1.0 ml der Probe + 10.0 ml Miniria)

Puffer	C-14EST ohne Membran	C-14-EST nach 5 Stunden
Phosphat	46.874 cpm	43.499 cpm - 7.2%
Imidazol	46.496 cpm	43.195 cpm - 7.1%
Barbital	47.089 cpm	42.521 cpm - 9.1%
Tris-EDTA	46.137 cpm	44.245 cpm - 4.1%
Tris+Albumin	46.578 cpm	46.578 cpm - 0%
Tris+Sucrose	46.734 cpm	43.650 cpm - 6.6%
Tris+$MgCl_2$+KCl	46.671 cpm	40.370 cpm - 13.5%
Tris+Dextran	46.527 cpm	43.503 cpm - 6.5%

Adsorption an die verschiedenen Membranen

In eine C14-EST-haltige Tris-Pufferlösung (pH-Wert 7.4) werden gleich große Membranstücke eingelegt.

Meßergebnis (Meßvolumen: 1.0 ml der Probe + 10.0 ml Miniria)

Membran	C14-EST ohne Membran	C14-EST nach 5 Std.	
Polyamid	46.598 cpm	8.667	-81.4%
Cellulose reg.	46.924 cpm	30.219	-35.6%
Celluloseacetat	46.203 cpm	6.099	-86.8%
Cellulosenitrat	46.589 cpm	2.795	-94.0%
Millipore PSED	46.738 cpm	4.627	-90.1%
Millipore PTGC	46.943 cpm	3.990	-91.5%
"visking dialyse"	47.127 cpm	35.487	-24.7%
Cellophan	46.529 cpm	44.387	- 4.6%

Adsorption an verschiedene Werkstoffe

In eine C14-EST-haltige Tris-Pufferlösung (pH-Wert 7.4) werden die verschiedenen Werkstoffe gleicher Größe eingelegt.

Meßergebnis

Werkstoff	C14-EST ohne Werkstoff	C14-EST nach 5 Std.	
Plexiglas	46.836 cpm	20.842	-55.5%
Polycarbamat	46.574 cpm	42.010	- 9.8%
PVC	46.749 cpm	15.006	-67.9%
Polyethylen	46.921 cpm	13.842	-70.5%
Glas	46.446 cpm	46.440	- 0%
Polyvinylacetat	46.934 cpm	21.449	-54.3%
Teflon	46.740 cpm	46.745	- 0%

Dialysedauer mit den neuen Dialysekammern

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: 37°C
4. Dialysedauer: 6 Stunden
5. Drehzahl der Proben : 40 U/min.
6. EST-Konzentration : 0.250 ml der C14-EST-Lösung + 10.0 ml Miniria 20 = 23.770 cpm
7. Probevolumen : 0.8 ml
8. Meßvolumen : 0.250 ml Probe + 10.0 ml Miniria 20

Meßergebnisse

a) mit Drehen der Dialysekammern

Zeit (min.)	0	15	30	60	90	120	150
1.Kammer (cpm)	23.770	15.847	14.210	11.604	11.247	11.196	11.014
2.Kammer (cpm)	0	6.307	7.825	10.526	10.859	10.863	11.116

b) ohne Drehen der Dialysekammern

Zeit (min.)	0	60	120	180	240	300
1.Kammer (cpm)	23.869	17.117	13.710	12.563	11.498	11.159
2.Kammer (cpm)	0	5.013	8.349	9.638	10.632	10.947

Bestimmung der Bindungskonstanten von EST an Rinderalbumin :

1. Puffer : Tris-EDTA
2. pH-Wert : 7.4
3. Temperatur : 37°C
4. Dialysezeit : 5 Stunden
5. Drehzahl der Proben : 40 U/min.

6. Proteinlösung : 2%ige Humanalbuminlösung in Tris-Puffer

7. Ligandenlösung: C14-EST: 1.0 ml = $9.075 \cdot 10^{-9}$ mol = $1.11 \cdot 10^{6}$ dpm = $9.5504 \cdot 10^{6}$ cpm (E%: 86.4)

8. Probevolumen : 1.Kammerhälfte: 0.8 ml Proteinlösung
2.Kammerhälfte: 0.8 ml EST-Lösung mit steigenden Konzentrationen

9. Meßvolumen : 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20

10. Auswertungsfaktor : 1.Kammerhälfte: $3.574 \cdot 10^{-11}$ (Q : +5.9%)
2.Kammerhälfte : $4.158 \cdot 10^{-11}$ (Q : -1.7%; Ad. : -7.4%)
3.Stammlösung : $3.850 \cdot 10^{-11}$ (Q : -1.7%)

Meßergebnisse

1.Kammerhälfte ≙ Proteinkammer [cpm]	2.Kammerhälfte ≙ Pufferkammer [cpm]	Stammlösung [cpm]
18.058	5.999	24.465
22.655	7.807	31.013
59.933	21.270	82.779
91.382	38.913	133.818
149.412	66.065	221.610
181.701	82.371	271.948

Proteinkammer [mol/l]	Pufferkammer [mol/l]	Stammlösung [mol/l]
$6.454 \cdot 10^{-7}$	$2.493 \cdot 10^{-7}$	$9.419 \cdot 10^{-7}$
$8.097 \cdot 10^{-7}$	$3.246 \cdot 10^{-7}$	$1.194 \cdot 10^{-6}$
$2.142 \cdot 10^{-6}$	$8.844 \cdot 10^{-7}$	$3.187 \cdot 10^{-6}$
$3.266 \cdot 10^{-6}$	$1.618 \cdot 10^{-6}$	$5.152 \cdot 10^{-6}$
$5.340 \cdot 10^{-6}$	$2.747 \cdot 10^{-6}$	$8.532 \cdot 10^{-6}$
$6.494 \cdot 10^{-6}$	$3.425 \cdot 10^{-6}$	$1.047 \cdot 10^{-5}$

c_g [mol/l]	c_f [mol/l]	c_f/c_g
$3.961 \cdot 10^{-7}$	$2.493 \cdot 10^{-7}$	1.59
$4.851 \cdot 10^{-7}$	$3.246 \cdot 10^{-7}$	1.49
$1.258 \cdot 10^{-6}$	$8.844 \cdot 10^{-7}$	1.42
$1.648 \cdot 10^{-6}$	$1.618 \cdot 10^{-6}$	1.02
$2.593 \cdot 10^{-6}$	$2.747 \cdot 10^{-6}$	0.94
$3.069 \cdot 10^{-6}$	$3.425 \cdot 10^{-6}$	0.90

1. $y = -2.64 \cdot 10^{5} \cdot x + 1.643$
2. $x = 6.22 \cdot 10^{-6}$ mol/l
3. $r = -0.94$
4. $K_A = 2.64 \cdot 10^{5}$ mol^{-1}
5. $K_D = 3.79 \cdot 10^{-6}$ mol
6. $n = 3.11 \cdot 10^{-7}$ mol/g

log [T] [mol/l]	log b
-6.19	-0.21
-6.09	-0.22
-5.67	-0.23
-5.49	-0.29
-5.27	-0.31
-5.19	-0.33

Bestimmung der Bindungskonstanten von DES an Rinderalbumin:

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: 37°C
4. Dialysezeit: 5 Stunden
5. Drehzahl der Proben: 40 U/min.
6. Proteinlösung: 2%ige Humanalbuminlösung in Tris-Puffer

7. Ligandenlösung: C14-DES in Tris-Puffer: $8.608 \cdot 10^{-8}$ mol
   $= 1.11 \cdot 10^{7}$ dpm $= 9.5904 \cdot 10^{6}$ cpm (E% : 86.4)

8. Probevolumen : 1.Kammerhälfte : 0.8 ml Proteinlösung
   2.Kammerhälfte : 0.8 ml DES-Lösung mit steigenden Konzentrationen

9. Meßvolumen : 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20

10. Auswertungsfaktor : 1.Kammerhälfte: $3.397 \cdot 10^{-11}$ (Q : +5.7%)
    2.Kammerhälfte : $3.940 \cdot 10^{-11}$ (Q : -1.8%, Ad. : -7.2%)
    3.Stammlösung : $3.656 \cdot 10^{-11}$ (Q : -1.8%)

Meßergebnisse

1. Kammerhälfte ≙ Proteinkammer [cpm]	2. Kammerhälfte ≙ Pufferkammer [cpm]	Stammlösung [cpm]
22.432	6.320	26.824
60.141	19.451	73.550
94.583	29.543	114.579
181.454	58.807	225.930
615.250	89.213	324.672
366.500	135.558	477.298

Proteinkammer [mol/l]	Pufferkammer [mol/l]	Stammlösung [mol/l]
$7.620 \cdot 10^{-7}$	$2.490 \cdot 10^{-7}$	$9.807 \cdot 10^{-7}$
$2.043 \cdot 10^{-6}$	$7.270 \cdot 10^{-7}$	$2.689 \cdot 10^{-6}$
$3.213 \cdot 10^{-6}$	$1.164 \cdot 10^{-6}$	$4.189 \cdot 10^{-6}$
$6.164 \cdot 10^{-6}$	$2.317 \cdot 10^{-6}$	$8.260 \cdot 10^{-6}$
$8.682 \cdot 10^{-6}$	$3.515 \cdot 10^{-6}$	$1.187 \cdot 10^{-5}$
$1.245 \cdot 10^{-5}$	$5.341 \cdot 10^{-6}$	$1.745 \cdot 10^{-5}$

c_g [mol/l]	c_f [mol/l]	c_g/c_f
$0.513 \cdot 10^{-6}$	$2.490 \cdot 10^{-7}$	2.06
$1.316 \cdot 10^{-6}$	$7.270 \cdot 10^{-7}$	1.81
$2.049 \cdot 10^{-6}$	$1.164 \cdot 10^{-6}$	1.76
$3.847 \cdot 10^{-6}$	$2.317 \cdot 10^{-6}$	1.66
$5.167 \cdot 10^{-6}$	$3.515 \cdot 10^{-6}$	1.47
$7.109 \cdot 10^{-6}$	$5.341 \cdot 10^{-6}$	1.33

1. $y = -0.999 \cdot 10^{5} x + 2.01$
2. $x = 2.02 \cdot 10^{-5}$ mol/l
3. $r = -0.97$
4. $K_A = 9.99 \cdot 10^{4}$ mol^{-1}
5. $K_D = 1.00 \cdot 10^{-5}$ mol
6. $n = 1.01 \cdot 10^{-6}$ mol/g

Bindungsanalysen mit Dextran-Kohle-Adsorptionsgemisch

1. Nicht adsorbierbare 3H-EST-Anteile im Überstand der Proben:

   Konzentration der Pufferlösung: 13.756 cpm/ml

   Konzentration des Überstandes nach einer Adsorptionszeit von 20 Minuten: 1.Probe: 146 cpm/ml, 2.Probe: 142 cpm/ml

   Es verbleiben 1.05% 3H-EST im Überstand.

2. Adsorption von 3H-EST aus Rinderalbuminlösung:

   1. Puffer: Tris-EDTA
   2. pH-Wert: 7.4
   3. Temperatur: $2^{o}C$
   4. Proteinkonzentration: 1%ige Rinderalbuminlösung in Tris-Puffer
   5. Ligandenkonzentration: 3H-EST in Tris-Puffer: 0.250 ml = 66.690 cpm

6. Probevolumen: 0.20 ml mit konstanter 3H-EST-Konzentration
7. Adsorption: Dextran-Kohle-Gemisch
8. Adsorptionsgemischvolumen: 0.50 ml
9. Adsorptionszeit: 0-360 Minuten
10. Drehzahl der Proben: 40 U/min.
11. Zentrifugenzeit: 4 Minuten bei 11.500 U/min. = 6.500 g
12. Meßvolumen: 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20
13. Auswertungsfaktor: 2.8

Meßergebnisse

Adsorptionszeit (min)	cpm im Überstand	cpm in 0.200 ml
0.5	2.393	6.700
1.0	1.698	4.754
2.0	1.077	3.014
4.0	1.035	2.898
8.0	844	2.363
16.0	716	2.006
32.0	601	1.682
60.0	511	1.430
180.0	454	1.272
360.0	376	1.053

3. Adsorption von 3H-EST aus dem "supernatant":

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: 2°C
4. Proteinkonzentration: 16.58 g/l (E= 0.197)
5. Ligandenkonzentration: 3H-EST in Tris-Puffer: 0.250 ml
   = 17.424 cpm
6. Probevolumen: 0.20 ml
7. Adsorption: Dextran-Kohle-Gemisch

8. Adsorptionsgemischvolumen : 0.50 ml
9. Adsorptionszeit : 0-128 Minuten
10. Drehzahl der Proben : 40 U/min.
11. Zentrifugenzeit : 4 Minuten bei 11.500 U/min.
12. Meßvolumen : 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20
13. Auswertungsfaktor: 2.8

Meßergebnisse

Adsorptionszeit (min)	cpm im Überstand	cpm/0.20 ml
1	5.913	16.556
2	5.761	16.131
4	5.762	16.134
8	5.674	15.887
16	5.574	15.607
32	5.524	15.467
64	5.349	14.977
128	5.404	15.131

Proteinbestimmung nach *Lowry*

Für die Eichkürve (Abb.51) werden 6 Proben mit unterschiedlichem Proteingehalt spektralphotometrisch bei 723 nm vermessen.

Meßergebnisse

Von einer Proteinstammlösung werden steigende Volumina auf 5.00 ml Tris-Puffer aufgefüllt.

Stammlösung: 14.7 mg Rinderalbumin (92%) /5.00 ml Tris-Puffer
= 13.52 mg BSA/5.00 ml

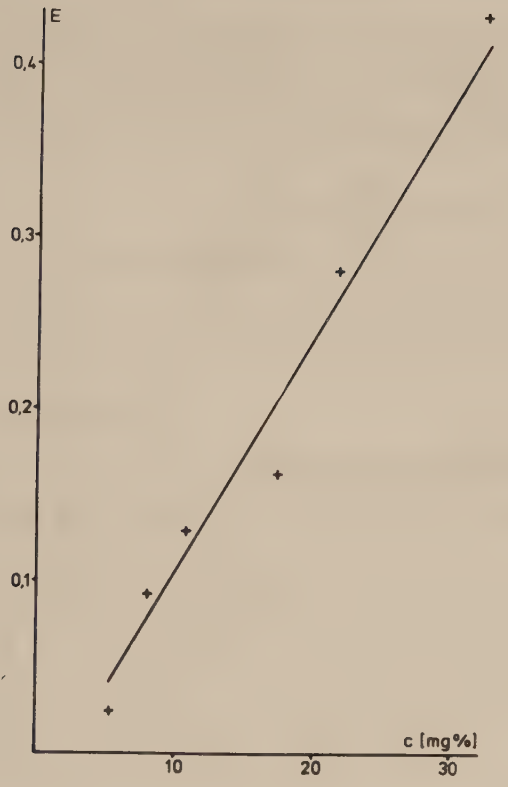


Abb.51. Eichkurve für die Bestimmung nach *Lowry* [33]

1. Lösung:	0.10	ml/5.00 ml	≙	5.41	mg/100.0 ml	≙	0.044	E
2. Lösung:	0.15	ml/5.00 ml	≙	8.11	mg/100.0 ml	≙	0.093	E
3. Lösung:	0.20	ml/5.00 ml	≙	10.82	mg/100.0 ml	≙	0.125	E
4. Lösung:	0.30	ml/5.00 ml	≙	16.23	mg/100.0 ml	≙	0.163	E
5. Lösung:	0.40	ml/5.00 ml	≙	21.64	mg/100.0 ml	≙	0.271	E
6. Lösung:	0.60	ml/5.00 ml	≙	32.46	mg/100.0 ml	≙	0.425	E

Durchführung der Proteinbestimmung nach *Lowry*

1.0 ml der Proteinlösung werden mit 5.0 ml Lösung 3 versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann werden 0.5 ml Lösung 4 dazugegeben und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen.

Anschließend wird bei 723 nm gemessen.

Die Proben sollten etwa 700-70 µg Protein enthalten.

1. $y = 1.38 \cdot 10^{-2} x - 0.031$

2. $x = 2.25$

3. $r = 0.994$

Die Ermittlung des Auswertungsfaktors

2 µl einer 3H-EST-Probe werden mit 34 µl Puffer und 450 µl Cytosol gemischt.

Nach: $2.551 \cdot 10^{-9}$ mol = $5.55 \cdot 10^{8}$ dpm = $1.776 \cdot 10^{8}$ cpm bei 32% Efficiency des Meßgeräts für Tritium müssen in 200 µl dieser Probe 8.323 cpm zu messen sein.

Im Versuch:

Hier werden die 200 µl der 3H-EST-Probe mit 500 µl Adsorptionsgemisch versetzt; hiervon werden 250 µl für die Messung abgenommen.

Gemessen werden: 2.490 cpm · 2.8 (Volumenkorrektur) =

6.972 cpm · 1.202 (Quenchkorrektur) =

8.380 cpm · 5.000 (Umrechnung in cpm/l) =

$4.19 \cdot 10^{7}$ cpm/l · $1.435 \cdot 10^{-17}$ (Umrechnung auf mol/l) =

$6.013 \cdot 10^{-10}$ mol/l.

Zusammenfassung:

	Volumenk.	Quench.	Umr. mol/l	
Probe x	$\frac{2.8 \times 1.000}{0.2}$	x 100 / x 83.2	x 2.551×10^{-9} / x 1.776×10^{8}	mol/l =
Probe x	2.417×10^{-13}	= 2.490 x 2.417×10^{-13}	= 6.018×10^{-10}	mol/l

Bestimmung der Bindungskonstanten von 3H-EST mit dem "supernatant" (Gl 4)

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: $2^{o}C$
4. Proteinkonzentration: 20.94 g/l (E= 0.258)
5. Ligandenkonzentration: 3H-EST in Tris-Puffer: $5.950 \cdot 10^{-9}$ mol = $1.776 \cdot 10^{8}$ cpm
6. Probevolumen: 0.20 ml
7. Adsorption: Dextran-Kohle-Gemisch
8. Adsorptionsgemischvolumen: 0.50 ml
9. Adsorptionszeit: 12 Minuten
10. Drehzahl der Proben: 40 U/min.
11. Zentrifugenzeit: 4 Minuten bei 11.500 U/min.
12. Meßvolumen: 0.20 ml + 10.0 ml Miniria 20
13. Auswertungsfaktor: $5.211 \cdot 10^{-13}$

Meßergebnisse

Stammlösung [cpm/0.20 ml]	cpm/0.20 ml (Überstand)
1.542	193
2.780	236
4.360	296
5.933	395
13.669	901
14.481	881
18.950	1.110
20.674	1.173
28.482	1.464

Stammlösung [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]	c_g/c_f
$8.035 \cdot 10^{-10}$	$1.006 \cdot 10^{-10}$	$7.030 \cdot 10^{-10}$	$14.31 \cdot 10^{-2}$
$1.449 \cdot 10^{-9}$	$1.230 \cdot 10^{-10}$	$1.326 \cdot 10^{-9}$	$9.28 \cdot 10^{-2}$
$2.272 \cdot 10^{-9}$	$1.542 \cdot 10^{-10}$	$2.118 \cdot 10^{-9}$	$7.28 \cdot 10^{-2}$
$3.092 \cdot 10^{-9}$	$2.058 \cdot 10^{-10}$	$2.886 \cdot 10^{-9}$	$7.13 \cdot 10^{-2}$
$7.123 \cdot 10^{-9}$	$4.695 \cdot 10^{-10}$	$6.654 \cdot 10^{-9}$	$7.06 \cdot 10^{-2}$
$7.546 \cdot 10^{-9}$	$4.591 \cdot 10^{-10}$	$7.087 \cdot 10^{-9}$	$6.48 \cdot 10^{-2}$
$9.875 \cdot 10^{-9}$	$5.784 \cdot 10^{-10}$	$9.297 \cdot 10^{-9}$	$6.22 \cdot 10^{-2}$
$1.077 \cdot 10^{-8}$	$6.113 \cdot 10^{-10}$	$1.016 \cdot 10^{-8}$	$6.02 \cdot 10^{-2}$
$1.484 \cdot 10^{-8}$	$7.629 \cdot 10^{-10}$	$1.408 \cdot 10^{-8}$	$5.42 \cdot 10^{-2}$

1.-3. Wert:

1. $y = -1.27 \cdot 10^{9} x + 26.27 \cdot 10^{-2}$
2. $r = 0.94$
3. $K_D = 7.88 \cdot 10^{-10}$ mol
4. $K_A = 1.27 \cdot 10^{9}$ mol^{-1}
5. $n = 9.88 \cdot 10^{-12}$ mol/g

2.-9. Wert:

$y = -2.88 \cdot 10^{7} x + 7.85 \cdot 10^{-2}$

$r = 0.92$

$K_D = 3.47 \cdot 10^{-8}$ mol

$K_A = 2.88 \cdot 10^{7}$ mol^{-1}

$n = 1.30 \cdot 10^{-10}$ mol/g

log [T][mol/l]	log b
-9.10	-0.90
-8.84	-1.07
-8.64	-1.17
-8.51	-1.18
-8.15	-1.18
-8.12	-1.22
-8.01	-1.23
-7.97	-1.25
-7.83	-1.29

Titration des "supernatant" mit hoher EST-Konzentration :(Gl 5)

1. Puffer : Tris-EDTA
2. pH-Wert : 7.4
3. Temperatur : $2^{o}C$
4. Proteinkonzentration : 17.94 g/l (E= 0.217)
5. Ligandenkonzentration : 3H-EST in Tris-Puffer : $5.95 \cdot 10^{-9}$ mol = $1.776 \cdot 10^{8}$ cpm (32% Eff.)
6. Probevolumen : 0.20 ml mit steigenden 3H-EST-Konzentratinen in Cytosol
7. Adsorption : Dextran-Kohle-Gemisch
8. Adsorptionsgemischvolumen: 0.50 ml
9. Adsorptionszeit : 12 Minuten
10. Drehzahl der Proben : 40 U/min.
11. Zentrifugenzeit : 4 Minuten bei 11.500 U/min.
12. Meßvolumen : 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20
13. Auswertungsfaktor: $5.006 \cdot 10^{-13}$ (Qu. 93.7%)

Meßergebnisse

Stammlösung [cpm/0.250 ml]	Überstand [cpm/0.250 ml]
46.684	4.091
78.366	6.101
132.821	9.059
388.534	16.161
470.236	18.714
543.748	37.570

Stammlösung [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]	c_g/c_f
$2.337 \cdot 10^{-8}$	$2.048 \cdot 10^{-9}$	$2.132 \cdot 10^{-8}$	$9.61 \cdot 10^{-2}$
$3.923 \cdot 10^{-8}$	$3.054 \cdot 10^{-9}$	$3.618 \cdot 10^{-8}$	$8.44 \cdot 10^{-2}$
$6.649 \cdot 10^{-8}$	$4.535 \cdot 10^{-9}$	$6.195 \cdot 10^{-8}$	$7.32 \cdot 10^{-2}$
$1.945 \cdot 10^{-7}$	$8.090 \cdot 10^{-9}$	$1.864 \cdot 10^{-7}$	$4.34 \cdot 10^{-2}$
$2.354 \cdot 10^{-7}$	$9.368 \cdot 10^{-9}$	$2.260 \cdot 10^{-7}$	$4.15 \cdot 10^{-2}$
$2.722 \cdot 10^{-7}$	$9.950 \cdot 10^{-9}$	$2.622 \cdot 10^{-7}$	$3.79 \cdot 10^{-2}$

1. $y = -7.31 \cdot 10^{6} x + 10.79 \cdot 10^{-2}$
2. $x = 1.475 \cdot 10^{-8}$ (mol·l)
3. $r = 0.99$
4. $K_A = 7.31 \cdot 10^{6}$ mol^{-1}
5. $K_D = 1.37 \cdot 10^{-7}$ mol
6. $n = 8.22 \cdot 10^{-10}$ mol/g

log [T] [mol/l]	log b
-7.63	-1.06
-7.41	-1.11
-7.18	-1.17
-6.71	-1.38
-6.63	-1.40
-6.57	-1.44

Titration des "supernantant" mit geringer 3H-EST-Konzentration (Gl 6)

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: $2^{o}C$
4. Proteinkonzentration: 18.26 g/l (E= 0.221)
5. Ligandenkonzentration: 3H-EST in Tris-Puffer: $2.551 \cdot 10^{-9}$ mol
   $= 1.776 \cdot 10^{8}$ cpm (32% Eff.)
6. Probevolumen: 0.20 ml
7. Adsorption: Dextran-Kohle-Gemisch
8. Adsorptionsgemischvolumen: 0.50 ml
9. Adsorptionszeit: 12 Minuten
10. Drehzahl der Proben: 40 U/min.
11. Zentrifugenzeit: 4 Minuten bei 11.500 U/min.
12. Meßvolumen: 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20
13. Auswertungsfaktor: $2.276 \cdot 10^{-13}$ (Qu. 88.35%)

Meßergebnisse

Stammlösung [cpm/0.250 ml]	Überstand [cpm/0.250 ml]
386	271
650	453
971	690
1.226	857
1.867	1.235
2.368	1.450
2.733	1.727
3.423	1.995

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]	c_g/c_f
$8.78 \cdot 10^{-11}$	$6.17 \cdot 10^{-11}$	$2.61 \cdot 10^{-11}$	2.36
$1.48 \cdot 10^{-10}$	$1.03 \cdot 10^{-10}$	$4.50 \cdot 10^{-11}$	2.29
$2.21 \cdot 10^{-10}$	$1.57 \cdot 10^{-10}$	$6.40 \cdot 10^{-11}$	2.45
$2.79 \cdot 10^{-10}$	$1.95 \cdot 10^{-10}$	$8.40 \cdot 10^{-11}$	2.32
$4.25 \cdot 10^{-10}$	$2.81 \cdot 10^{-10}$	$1.44 \cdot 10^{-10}$	1.95
$5.39 \cdot 10^{-10}$	$3.30 \cdot 10^{-10}$	$2.09 \cdot 10^{-10}$	1.58
$6.22 \cdot 10^{-10}$	$3.93 \cdot 10^{-10}$	$2.29 \cdot 10^{-10}$	1.72
$7.79 \cdot 10^{-10}$	$4.54 \cdot 10^{-10}$	$3.25 \cdot 10^{-10}$	1.40

1. $y = -2.66 \cdot 10^{9} x + 2.67$
2. $x = 1.00 \cdot 10^{-9}$ (mol/l)
3. $r = 0.93$
4. $K_A = 2.66 \cdot 10^{9}$ mol^{-1}
5. $K_D = 3.76 \cdot 10^{-10}$ mol
6. $n = 5.48 \cdot 10^{-11}$ mol/g

log [T] [mol/l]	log b
-10.06	-0.15
- 9.83	-0.16
- 9.66	-0.15
- 9.55	-0.16
- 9.37	-0.18
- 9.27	-0.21
- 9.21	-0.20
- 9.11	-0.23

Titration des "supernatant" mit 3H-EST und H-EST (Gl 7)

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: $2^{o}C$
4. Proteinkonzentration: 24.86 g/l (E= 0.312)
5. Ligandenkonzentration: 3H-EST in Tris-Puffer mit steigenden Konzentrationen ($2.551 \cdot 10^{-9}$ mol = $1.776 \cdot 10^{8}$ cpm = 32% Eff.) + H-EST mit konstanter Konzentration = $1.05 \cdot 10^{-6}$ mol/l
6. Probevolumen: 0.20 ml
7. Adsorption: Dextran-Kohle-Gemisch
8. Adsorptionsgemischvolumen: 0.50 ml
9. Adsorptionszeit: 12 Minuten
10. Drehzahl der Proben: 40 U/min.
11. Zentrifugenzeit: 4 Minuten
12. Meßvolumen: 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20
13. Auswertungsfaktor: 1) $2.294 \cdot 10^{-13}$ (Qu.= 87.66)
    2) $2.303 \cdot 10^{-13}$ (Qu.= 87.31)

Meßergebnisse

1.Stammlösung [cpm/0.250 ml]	Überstand [cpm/0.250 ml]
549	102
1.530	277
2.437	449
3.553	545
4.664	676
4.255	671

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]
$1.26 \cdot 10^{-10}$	$2.34 \cdot 10^{-11}$	$1.026 \cdot 10^{-10}$
$3.51 \cdot 10^{-10}$	$6.35 \cdot 10^{-11}$	$2.875 \cdot 10^{-10}$
$5.59 \cdot 10^{-10}$	$1.03 \cdot 10^{-10}$	$4.560 \cdot 10^{-10}$
$8.15 \cdot 10^{-10}$	$1.25 \cdot 10^{-10}$	$6.9 \cdot 10^{-10}$
$1.07 \cdot 10^{-9}$	$1.55 \cdot 10^{-10}$	$9.15 \cdot 10^{-10}$
$9.76 \cdot 10^{-10}$	$1.54 \cdot 10^{-10}$	$8.22 \cdot 10^{-10}$

2. Stammlösung [cpm/0.250 ml] 3H-EST + H-EST	Überstand [cpm/0.250 ml]
534	38
1.568	33
2.432	48
3.469	72
4.386	87
5.384	96
6.383	104
7.165	159
8.250	166
9.075	153

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]
$1.23 \cdot 10^{-10}$	$8.72 \cdot 10^{-12}$	$1.1428 \cdot 10^{-10}$
$3.61 \cdot 10^{-10}$	$7.57 \cdot 10^{-12}$	$3.5343 \cdot 10^{-10}$
$5.60 \cdot 10^{-10}$	$1.10 \cdot 10^{-11}$	$5.490 \cdot 10^{-10}$
$7.99 \cdot 10^{-10}$	$1.65 \cdot 10^{-11}$	$7.825 \cdot 10^{-10}$
$1.01 \cdot 10^{-9}$	$2.00 \cdot 10^{-11}$	$9.90 \cdot 10^{-10}$
$1.24 \cdot 10^{-9}$	$2.20 \cdot 10^{-11}$	$1.218 \cdot 10^{-9}$
$1.47 \cdot 10^{-9}$	$2.39 \cdot 10^{-11}$	$1.446 \cdot 10^{-9}$
$1.65 \cdot 10^{-9}$	$3.65 \cdot 10^{-11}$	$1.6135 \cdot 10^{-9}$
$1.90 \cdot 10^{-9}$	$3.81 \cdot 10^{-11}$	$1.8619 \cdot 10^{-9}$
$2.09 \cdot 10^{-9}$	$3.51 \cdot 10^{-11}$	$2.0549 \cdot 10^{-9}$

Bestimmung der Bindungskonstanten von EST und "supernatant" mit der Dialysemethode (G1 12)

1. Puffer : Tris-EDTA
2. pH-Wert : 7.4
3. Temperatur : $2^{o}C$
4. Proteinkonzentration : 22.25 g/l (E= 0.276)
5. Ligandenkonzentration : 3H-EST in Tris-Puffer : $4 \cdot 10^{-11}$ mol/l
   - $4 \cdot 10^{-10}$ mol/l
6. Probevolumen : 1. Kammerhälfte : 0.8 ml "supernatant"
   2. Kammerhälfte : 0.8 ml 3H-EST-Lösung in steigenden Konzentrationen
7. Dialysezeit : 5 Stunden
8. Drehzahl der Kammern : 40 U/min.
9. Meßvolumen : 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20
10. Auswertungsfaktor : 1) $6.278 \cdot 10^{-14}$ (Puffer; Qu.: -1.7%)
    2) $6.441 \cdot 10^{-14}$ (Protein; Qu.: -10.8)

Meßergebnisse

Pufferkammer [cpm/250 µl]	Proteinkammer [cpm/250 µl]
229	654
416	1.150
937	2.605
1.215	3.436
1.625	4.580
2.134	5.822

c_T [mol/l]	c_f [mol/l]	c_g [mol/l]	c_g/c_f
$4.21 \cdot 10^{-11}$	$1.44 \cdot 10^{-11}$	$2.77 \cdot 10^{-11}$	1.92
$7.40 \cdot 10^{-11}$	$2.61 \cdot 10^{-11}$	$4.80 \cdot 10^{-11}$	1.84
$1.68 \cdot 10^{-10}$	$5.88 \cdot 10^{-11}$	$1.09 \cdot 10^{-10}$	1.86
$2.21 \cdot 10^{-10}$	$7.63 \cdot 10^{-11}$	$1.45 \cdot 10^{-10}$	1.90
$2.94 \cdot 10^{-10}$	$1.02 \cdot 10^{-10}$	$1.93 \cdot 10^{-10}$	1.90
$3.75 \cdot 10^{-10}$	$1.34 \cdot 10^{-10}$	$2.41 \cdot 10^{-10}$	1.80

1. $y = -2.31 \cdot 10^{8} x + 1.90$
2. $K_A = 2.31 \cdot 10^{8}$ mol^{-1}
3. $K_D = 4.33 \cdot 10^{-9}$ mol
4. $n = 3.70 \cdot 10^{-10}$ mol/g

log [T] [mol/l]	log b
-10.38	-0.18
-10.13	-0.19
- 9.77	-0.19
- 9.66	-0.18
- 9.53	-0.18
- 9.43	-0.19

Titration des "supernatant" mit 3H-EST und H-EST mit der Dialyse-methode

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: 2°C
4. Proteinkonzentration: 23.33 g/l (E= 0.291)
5. Ligandenkonzentration: 3H-EST in Tris-Puffer: $2 \cdot 10^{-10}$ mol/l
   - $3.6 \cdot 10^{-10}$ mol/l

H-EST in Tris-Puffer: $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l = const.

6. Probevolumen: 1.Kammerhälfte: 0.8 ml "supernantant"
   2.Kammerhälfte: 0.8 ml Ligandenlösung
7. Dialysezeit: 5 Stunden
8. Drehzahl der Kammern: 40 U/min.
9. Meßvolumen: 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20
10. Auswertungsfaktor: 1) $6.264 \cdot 10^{-14}$ (Ad. 6.6%) (Puffer; Q:1.8%)
    2) $6.470 \cdot 10^{-14}$ (Protein; Q: 11.2%)

Meßergebnisse

1. Ligandenlösung: 3H-EST: Pufferkammer [cpm/250 µl]	Proteinkammer [cpm/250 µl]
228	655
407	1.145
1.070	2.581
1.054	3.416
1.612	4.544
1.644	5.780

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]
$4.24 \cdot 10^{-11}$	$2.81 \cdot 10^{-11}$	1.43 E-11
$7.41 \cdot 10^{-11}$	$4.86 \cdot 10^{-11}$	2.55 E-11
$1.67 \cdot 10^{-10}$	$1.00 \cdot 10^{-10}$	6.7 E-11
$2.21 \cdot 10^{-10}$	$1.55 \cdot 10^{-10}$	6.6 E-11
$2.94 \cdot 10^{-10}$	$1.93 \cdot 10^{-10}$	1.01 E-10
$3.74 \cdot 10^{-10}$	$2.71 \cdot 10^{-10}$	1.03 E-10

2. Ligandenlösung: 3H-EST + H-EST: Pufferkammer [cpm(250 µl]	Proteinkammer [cpm/250 µl]
286	604
974	1.870
907	2.411
1.564	4.023
1.916	5.124
2.219	5.719

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]
$3.91 \cdot 10^{-11}$	$2.12 \cdot 10^{-11}$
$1.21 \cdot 10^{-10}$	$6.00 \cdot 10^{-11}$
$1.56 \cdot 10^{-10}$	$9.92 \cdot 10^{-11}$
$2.52 \cdot 10^{-10}$	$1.54 \cdot 10^{-10}$
$3.21 \cdot 10^{-10}$	$2.01 \cdot 10^{-10}$
$3.70 \cdot 10^{-10}$	$2.31 \cdot 10^{-10}$

Titration des "supernatant" mit 3H-EST unter Zusatz von H-EST oder H-DES

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert: 7.4
3. Temperatur: $2^{\circ}C$
4. Proteinkonzentration: 21.09 g/l (E= 0.260)
5. Ligandenkonzentration: 3H-EST in Tris-Puffer: $1 \cdot 10^{-10}$ mol/l - $2 \cdot 10^{-9}$ mol/l

   H-EST und H-DES in Tris-Puffer: $4.9 \cdot 10^{-9}$ mol/l = const. und $8.8 \cdot 10^{-7}$ mol/l = const.
6. Probevolumen: 0.20 ml
7. Adsorption: Dextran-Kohle-Gemisch

8. Adsorptionsgemischvolumen: 0.50 ml

9. Adsorptionszeit: 12 Minuten

10. Drehzahl der Proben: 40 U/min.

11. Zentrifugenzeit: 4 Minuten

12. Meßvolumen: 0.250 ml + 10.0 ml Miniria 20

13. Auswertungsfaktor: $2.257 \cdot 10^{-13}$ (Q= 91.6%)

Meßergebnisse

1. Ligandenlösung: 3H-EST: Stammlösung [cpm/250 µl]	Überstand [cpm/250 µl]
470	102
2.432	206
4.475	367
7.222	474
9.216	629

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]
$1.06 \cdot 10^{-10}$	$2.32 \cdot 10^{-11}$	$8.28 \cdot 10^{-11}$
$5.49 \cdot 10^{-10}$	$4.64 \cdot 10^{-11}$	$5.026 \cdot 10^{-10}$
$1.01 \cdot 10^{-9}$	$8.29 \cdot 10^{-11}$	$9.271 \cdot 10^{-10}$
$1.63 \cdot 10^{-9}$	$1.07 \cdot 10^{-10}$	$1.523 \cdot 10^{-9}$
$2.08 \cdot 10^{-9}$	$1.42 \cdot 10^{-10}$	$1.938 \cdot 10^{-9}$

2. Ligandenlösung: 3H-EST + H-EST ($4.9 \cdot 10^{-9}$ mol/l=const) Stammlösung [cpm/250 µl]	Überstand [cpm/250 µl]
483	27
1.484	80
2.494	118
3.354	164
4.519	293
5.494	318
7.355	452
9.437	594

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]
$1.09 \cdot 10^{-10}$	$5.99 \cdot 10^{-12}$	$1.0301 \cdot 10^{-10}$
$3.35 \cdot 10^{-10}$	$1.81 \cdot 10^{-11}$	$3.169 \cdot 10^{-10}$
$5.63 \cdot 10^{-10}$	$2.67 \cdot 10^{-11}$	$5.363 \cdot 10^{-10}$
$7.57 \cdot 10^{-10}$	$3.70 \cdot 10^{-11}$	$7.20 \cdot 10^{-10}$
$1.02 \cdot 10^{-9}$	$6.61 \cdot 10^{-11}$	$9.539 \cdot 10^{-10}$
$1.24 \cdot 10^{-9}$	$7.18 \cdot 10^{-11}$	$1.1682 \cdot 10^{-9}$
$1.66 \cdot 10^{-9}$	$1.02 \cdot 10^{-10}$	$1.558 \cdot 10^{-9}$
$2.13 \cdot 10^{-9}$	$1.34 \cdot 10^{-10}$	$1.956 \cdot 10^{-9}$

3. Ligandenlösung: 3H-EST + H-DES ($4.9 \cdot 10^{-9}$ mol/l = const.)

Stammlösung [cpm/250 µl]	Überstand [cpm/250 µl]
558	37
1.374	70
2.556	122
3.664	214
4.608	253
5.538	323
7.665	487

c_T [mol/l]	c_g [mol/l]	c_f [mol/l]
$1.26 \cdot 10^{-10}$	$8.44 \cdot 10^{-12}$	$1.1756 \cdot 10^{-10}$
$3.10 \cdot 10^{-10}$	$1.58 \cdot 10^{-11}$	$2.942 \cdot 10^{-10}$
$5.77 \cdot 10^{-10}$	$2.76 \cdot 10^{-11}$	$5.494 \cdot 10^{-10}$
$8.27 \cdot 10^{-10}$	$4.83 \cdot 10^{-11}$	$7.787 \cdot 10^{-10}$
$1.04 \cdot 10^{-9}$	$5.72 \cdot 10^{-11}$	$9.818 \cdot 10^{-10}$
$1.25 \cdot 10^{-9}$	$7.30 \cdot 10^{-11}$	$1.177 \cdot 10^{-9}$
$1.73 \cdot 10^{-9}$	$1.10 \cdot 10^{-10}$	$1.62 \cdot 10^{-9}$

4. Ligandenlösung: 3H-EST + H-EST ($8.8 \cdot 10^{-7}$ mol/l):

Stammlösung [cpm/250 µl]: 8.950

Überstand [cpm/250 µl]: 215

c_T [mol/l]: $2.02 \cdot 10^{-9}$

c_g [mol/l]: $4.85 \cdot 10^{-11}$

5. Ligandenlösung: 3H-EST + H-DES ($8.8 \cdot 10^{-7}$ mol/l)

Stammlösung [cpm/250 µl]: 7.665

Überstand [cpm/250 µl]: 169

c_t [mol/l]: $1.73 \cdot 10^{-9}$

c_g [mol/l]: $3.82 \cdot 10^{-11}$

Verdrängungsraten der Diethylstilböstrolanalogen

1. Puffer: Tris-EDTA
2. pH-Wert : 7.4
3. Temperatur : $2^{o}C$
4. Proteinkonzentration : 18.64 g/l (E= 0.226)
5. Ligandenkonzentration : H3-EST in Tris-Puffer : $1 \cdot 10^{-10}$ mol/l; Testsubstanzen in Tris-Puffer : $1 \cdot 10^{-7}$ mol/l
6. Probevolumen : 0.2 ml
7. Adsorption : Dextran-Kohle-Gemisch
8. Adsorptionsgemischvolumen : 0.5 ml
9. Adsorptionszeit : 12 Minuten
10. Drehzahl der Proben : 40 U/min.
11. Zentrifugenzeit : 4 Minuten
12. Meßvolumen : 0.250 ml Probe + 10.0 ml Miniria 20
13. Auswertungsfaktor: 2.8

Meßergebnisse

Test-substanz	c_g an H3-EST [cpm/250 µl]	c_g an H3-EST nach Zusatz der Test-substanz [cpm/250 µl]
A 1	1.464	1.288
A 2	1.518	837
A 3	1.767	1.313
A 4	2.307	1.344
A 5	2.786	1.140
A 6	2.408	2.170
A 7	3.054	1.014
A 8	1.646	162
A 9	3.060	465
A 10	2.727	949
A 11	2.952	252
A 12	2.514	1.252
A 13	1.756	185
A 14	3.072	1.663
A 15	2.948	983
A 16	2.164	1.098
A 17	2.971	305
A 18	2.848	641

Berechnung der Bindungskonstanten nach *Scatchard* (SCATCH)

Gl 5.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz. Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.21320 E - 07	0.11416 E - 09	0.11083 E - 09	2.9%
0.36180 E - 07	0.17023 E - 09	0.17193 E - 09	-1.0%
0.61950 E - 07	0.25279 E - 09	0.25622 E - 09	-1.4%
0.18640 E - 06	0.45095 E - 09	0.47408 E - 09	-5.1%
0.22600 E - 06	0.52219 E - 09	0.51205 E - 09	1.9%
0.26220 E - 06	0.55463 E - 09	0.54017 E - 09	2.6%

SFQ= 0.10048 E + 01
K1 = 0.73100 E + 07 N1= 0.82200 E - 09
N = 7

Gl 6.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz. Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.26100 E - 10	0.33790 E - 11	0.35576 E - 11	-5.3%
0.45000 E - 10	0.56407 E - 11	0.58583 E - 11	-3.9%
0.64000 E - 10	0.85980 E - 11	0.79720 E - 11	7.3%
0.84000 E - 10	0.10679 E - 10	0.10008 E - 10	6.3%
0.14400 E - 09	0.15389 E - 10	0.15177 E - 10	1.4%
0.20900 E - 09	0.18072 E - 10	0.19580 E - 10	-8.3%
0.22900 E - 09	0.21522 E - 10	0.20745 E - 10	3.6%
0.32500 E - 09	0.24863 E - 10	0.25409 E - 10	-2.2%

SFQ= 0.10225 E + 01
K1 = 0.26600 E + 10 N1= 0.54800 E - 10
N = 9

Gl 7.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.10260 E - 09	0.94127 E - 12	0.13088 E - 11	-39.0%
0.28750 E - 09	0.25543 E - 11	0.34150 E - 11	-33.7%
0.45600 E - 09	0.41432 E - 11	0.50967 E - 11	-23.0%
0.69000 E - 09	0.50282 E - 11	0.71277 E - 11	-41.8%
0.91500 E - 09	0.62349 E - 11	0.88101 E - 11	-41.3%
0.82200 E - 09	0.61947 E - 11	0.81432 E - 11	-31.5%

SFQ= 0.17629 E + 01
K1 = 0.41700 E + 09 N1= 0.31900 E - 10
N = 7

Gl 9.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.82800 E - 10	0.11000 E - 11	0.80738 E - 12	26.6%
0.50260 E - 09	0.22001 E - 11	0.33449 E - 11	-52.0%
0.92710 E - 09	0.39308 E - 11	0.46706 E - 11	-18.8%
0.15230 E - 08	0.50735 E - 11	0.57210 E - 11	-12.8%
0.19380 E - 08	0.67330 E - 11	0.61843 E - 11	8.1%

SFQ= 0.13999 E + 01
K1 = 0.12200 E + 10 N1= 0.88000 E - 11
N = 6

Gl 12.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14400 E - 10	0.12449 E - 11	0.12267 E - 11	1.5%
0.26100 E - 10	0.21573 E - 11	0.22174 E - 11	-2.8%
0.58800 E - 10	0.48989 E - 11	0.49583 E - 11	-1.2%
0.76300 E - 10	0.65169 E - 11	0.64084 E - 11	1.7%
0.10200 E - 09	0.86742 E - 11	0.85173 E - 11	1.8%
0.13400 E - 09	0.10831 E - 10	0.11109 E - 10	-2.6%

SFQ= 0.10024 E + 01
K1 = 0.23100 E + 09 N1= 0.37000 E - 09
N = 7

VV 2.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.22390 E - 09	0.44354 E - 11	0.50333 E - 11	-13.5%
0.16520 E - 09	0.34253 E - 11	0.40884 E - 11	-19.4%
0.41460 E - 09	0.59849 E - 11	0.71821 E - 11	-20.0%
0.64710 E - 09	0.77666 E - 11	0.87597 E - 11	-12.8%
0.92740 E - 09	0.83563 E - 11	0.99359 E - 11	-18.9%
0.10703 E - 08	0.92597 E - 11	0.10365 E - 10	-11.9%
0.12106 E - 08	0.95232 E - 11	0.10713 E - 10	-12.5%
0.13360 E - 08	0.90025 E - 11	0.10977 E - 10	-21.9%
0.10396 E - 08	0.83940 E - 11	0.10280 E - 10	-22.5%

SFQ= 0.12762 E + 01
K1 = 0.24000 E + 10 N1= 0.14400 E - 10
N = 10

VV3.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz. Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14900 E - 09	0.23054 E - 11	0.23359 E - 11	-1.3%
0.30590 E - 09	0.50593 E - 11	0.41351 E - 11	18.3%
0.48660 E - 09	0.55448 E - 11	0.56773 E - 11	-2.4%
0.62400 E - 09	0.68868 E - 11	0.65940 E - 11	4.3%
0.83060 E - 09	0.83467 E - 11	0.76874 E - 11	7.9%
0.10639 E - 08	0.77829 E - 11	0.86358 E - 11	-11.0%
0.12296 E - 08	0.88389 E - 11	0.91791 E - 11	-3.8%
0.13276 E - 08	0.96088 E - 11	0.94612 E - 11	1.5%

SFQ= 0.10559 E + 01
K1 = 0.12000 E + 10 N1= 0.15400 E -10
N = 9

VV4.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.38590 E - 10	0.44892 E - 11	0.57162 E - 11	-27.3%
0.41060 E - 10	0.43976 E - 11	0.60506 E - 11	-37.6%
0.66000 E - 10	0.60434 E - 11	0.92432 E - 11	-52.9%
0.62590 E - 10	0.65408 E - 11	0.88255 E - 11	-34.9%
0.73300 E - 10	0.89763 E - 11	0.10119 E - 10	-12.7%
0.79100 E - 10	0.87537 E - 11	0.10797 E - 10	-23.3%
0.93100 E - 10	0.98850 E - 11	0.12372 E - 10	-25.2%
0.11560 E - 09	0.13240 E - 10	0.14736 E - 10	-11.3%
0.22300 E - 09	0.15994 E - 10	0.23798 E - 10	-48.8%
0.20300 E - 09	0.18164 E - 10	0.22341 E - 10	-23.0%
0.39270 E - 09	0.24036 E - 10	0.33333 E - 10	-38.7%

SFQ= 0.22056 E + 01
K1 = 0.22900 E + 10 N1= 0.70400 E - 10
N = 12

VV 9.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.26100 E - 10	0.33790 E - 11	0.44430 E - 11	-31.5%
0.45000 E - 10	0.56407 E - 11	0.73153 E - 11	-29.7%
0.64000 E - 10	0.85980 E - 11	0.99532 E - 11	-15.8%
0.84000 E - 10	0.10679 E - 10	0.12494 E - 10	-17.0%
0.14400 E - 09	0.15389 E - 10	0.18940 E - 10	-23.1%
0.20900 E - 09	0.18072 E - 10	0.24427 E - 10	-35.2%
0.22900 E - 09	0.21522 E - 10	0.25877 E - 10	-20.2%
0.32500 E - 09	0.24863 E - 10	0.31685 E - 10	-27.4%

SFQ= 0.15342 E + 01
K1 = 0.26700 E + 10 N1= 0.68200 E - 10
N = 9

Berechnung der Bindungskonstanten nach Gleichung 3 (SIMFIM)

Gl 5.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.21320 E - 07	0.11416 E - 09	0.11115 E - 09	2.6%
0.36180 E - 07	0.17023 E - 09	0.17226 E - 09	-1.2%
0.61950 E - 07	0.25279 E - 09	0.25638 E - 09	-1.4%
0.18640 E - 06	0.45095 E - 09	0.47280 E - 09	-4.8%
0.22600 E - 06	0.52219 E - 09	0.51038 E - 09	2.3%
0.26220 E - 06	0.55463 E - 09	0.53818 E - 09	3.0%

SFQ= 0.10048 E + 01
K1 = 0.74020 E + 07 N1= 0.81548 E - 09
N = 7

Gl 6.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.26100 E - 10	0.33790 E - 11	0.37610 E - 11	-11.3%
0.45000 E - 10	0.56407 E - 11	0.61276 E - 11	-8.6%
0.64000 E - 10	0.85980 E - 11	0.82580 E - 11	4.0%
0.84000 E - 10	0.10679 E - 10	0.10272 E - 10	3.8%
0.14400 E - 09	0.15389 E - 10	0.15221 E - 10	1.1%
0.20900 E - 09	0.18072 E - 10	0.19262 E - 10	-6.6%
0.22900 E - 09	0.21522 E - 10	0.20305 E - 10	5.7%
0.32500 E - 09	0.24863 E - 10	0.24380 E - 10	1.9%

SFQ= 0.74243 E + 00
K1 = 0.33505 E + 10 N1= 0.46769 E - 10
N = 9

Gl 7.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.10260 E - 09	0.94127 E - 12	0.97628 E - 12	-3.7%
0.28750 E - 09	0.25543 E - 11	0.25354 E - 11	0.7%
0.45600 E - 09	0.41432 E - 11	0.37700 E - 11	9.0%
0.69000 E - 09	0.50282 E - 11	0.52488 E - 11	-4.4%
0.91500 E - 09	0.62349 E - 11	0.64638 E - 11	-3.7%
0.82200 E - 09	0.61947 E - 11	0.59832 E - 11	3.4%

SFQ= 0.10140 E + 01
K1 = 0.44667 E + 09 N1= 0.22279 E - 10
N = 7

Gl 9.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.82800 E - 10	0.11000 E - 11	0.73964 E - 12	32.8%
0.50260 E - 09	0.22000 E - 11	0.29242 E - 11	-32.9%
0.92710 E - 09	0.39308 E - 11	0.39879 E - 11	-1.5%
0.15230 E - 08	0.50735 E - 11	0.47961 E - 11	5.5%
0.19380 E - 08	0.67330 E - 11	0.51434 E - 11	23.6%

SFQ= 0.12746 E + 01
K1 = 0.14258 E + 01 N1= 0.70074 E - 11
N = 6

Gl 12.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14400 E - 10	0.12449 E - 11	0.12254 E - 11	1.6%
0.26100 E - 10	0.21573 E - 11	0.22141 E - 11	-2.6%
0.58800 E - 10	0.48989 E - 11	0.49447 E - 11	-0.9%
0.76300 E - 10	0.65169 E - 11	0.63867 E - 11	2.0%
0.10200 E - 09	0.86742 E - 11	0.84804 E - 11	2.2%
0.13400 E - 09	0.10831 E - 10	0.11048 E - 10	-2.0%

SFQ= 0.10023 E + 01
K1 = 0.26948 E + 09 N1= 0.31701 E - 09
N = 7

VV 1.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14013 E - 08	0.10730 E - 10	0.91583 E - 11	14.6%
0.30066 E - 08	0.14494 E - 10	0.14866 E - 10	-2.6%
0.42475 E - 08	0.18447 E - 10	0.17676 E - 10	4.2%
0.57770 E - 08	0.17132 E - 10	0.20114 E - 10	-17.4%
0.68466 E - 08	0.16756 E - 10	0.21395 E - 10	-27.7%
0.82500 E - 08	0.22883 E - 10	0.22724 E - 10	0.7%
0.84973 E - 08	0.27298 E - 10	0.22926 E - 10	16.0%
0.11647 E - 07	0.29653 E - 10	0.24928 E - 10	15.9%
0.12399 E - 07	0.30592 E - 10	0.25289 E - 10	17.3%

SFQ= 0.12120 E + 01
K1 = 0.27873 E + 09 N1= 0.32606 E - 10
N = 10

VV 2.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.22390 E - 09	0.44354 E - 11	0.45224 E - 11	-2.0%
0.16520 E - 09	0.34253 E - 11	0.37243 E - 11	-8.7%
0.41460 E - 09	0.59849 E - 11	0.62587 E - 11	-4.6%
0.64710 E - 09	0.77666 E - 11	0.74683 E - 11	3.8%
0.92740 E - 09	0.83563 E - 11	0.83367 E - 11	0.2%
0.10703 E - 08	0.92597 E - 11	0.86466 E - 11	6.6%
0.12106 E - 08	0.95232 E - 11	0.88953 E - 11	6.6%
0.13360 E - 08	0.90025 E - 11	0.90823 E - 11	-0.9%
0.10396 E - 08	0.83940 E - 11	0.85854 E - 11	-2.3%

SFQ= 0.95505 E + 00
K1 = 0.29387 E + 10 N1= 0.11396 E - 10
N = 10

VV 3.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14900 E - 09	0.23054 E - 11	0.24841 E - 11	-7.7%
0.30590 E - 09	0.50593 E - 11	0.43055 E - 11	14.9%
0.48660 E - 09	0.55448 E - 11	0.58072 E - 11	-4.7%
0.62400 E - 09	0.68868 E - 11	0.66750 E - 11	3.1%
0.83060 E - 09	0.83467 E - 11	0.76869 E - 11	7.9%
0.10639 E - 08	0.77829 E - 11	0.85448 E - 11	-9.8%
0.12296 E - 08	0.88389 E - 11	0.90283 E - 11	-2.1%
0.13276 E - 08	0.96088 E - 11	0.92770 E - 11	3.5%

SFQ= 0.10489 E + 01
K1 = 0.14255 E + 10 N1= 0.14179 E - 10
N = 9

VV 4.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.38590 E - 10	0.44892 E - 11	0.45357 E - 11	-1.0%
0.41060 E - 10	0.43976 E - 11	0.47945 E - 11	-9.0%
0.66000 E - 10	0.60434 E - 11	0.72286 E - 11	-19.6%
0.62590 E - 10	0.65408 E - 11	0.69138 E - 11	-5.7%
0.73300 E - 10	0.89763 E - 11	0.78850 E - 11	12.2%
0.79100 E - 10	0.87537 E - 11	0.83901 E - 11	4.2%
0.93100 E - 10	0.98850 E - 11	0.95529 E - 11	3.4%
0.11560 E - 09	0.13240 E - 10	0.11271 E - 10	14.9%
0.22300 E - 09	0.15994 E - 10	0.17566 E - 10	-9.8%
0.20300 E - 09	0.18164 E - 10	0.16584 E - 10	8.7%
0.39270 E - 09	0.24036 E - 10	0.23730 E - 10	1.3%

SFQ= 0.86222 E + 00
K1 = 0.29752 E + 10 N1= 0.44041 E - 10
N = 12

V 9.DAT

Frei	Gebunden	Bindung	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.26100 E - 10	0.33790 E - 11	0.37617 E - 11	-11.3%
0.45000 E - 10	0.56407 E - 11	0.61285 E - 11	-8.6%
0.64000 E - 10	0.85980 E - 11	0.82590 E - 11	3.9%
0.84000 E - 10	0.10679 E - 10	0.10273 E - 10	3.8%
0.14400 E - 09	0.15389 E - 10	0.15221 E - 10	1.1%
0.20900 E - 09	0.18072 E - 10	0.19261 E - 10	-6.6%
0.22900 E - 09	0.21522 E - 10	0.20304 E - 10	5.7%
0.32500 E - 10	0.24863 E - 10	0.24378 E - 10	2.0%

SFQ= 0.74243 E + 00

K1 = 0.33526 E + 10 N1= 0.46751 E - 10

N = 9

Gl 4.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.70300 E - 09	0.48024 E - 11	0.25719 E - 11	0.18506 E - 11	0.38175 E - 12	7.9%
0.13260 E - 08	0.58739 E - 11	0.25763 E - 11	0.34869 E - 11	-0.18930 E - 12	-3.2%
0.21180 E - 08	0.73639 E - 11	0.25782 E - 11	0.55621 E - 11	-0.77638 E - 12	-10.5%
0.28860 E - 08	0.98281 E - 11	0.25790 E - 11	0.75691 E - 11	-0.32004 E - 12	-3.3%
0.66540 E - 08	0.22421 E - 10	0.25803 E - 11	0.17341 E - 10	0.24996 E - 12	11.1%
0.70870 E - 08	0.21925 E - 10	0.25804 E - 11	0.18456 E - 10	0.88847 E - 12	4.1%
0.92970 E - 08	0.27622 E - 10	0.25806 E - 11	0.24122 E - 10	0.91931 E - 12	3.3%
0.10160 E - 07	0.29193 E - 10	0.25807 E - 11	0.26323 E - 10	0.28907 E - 12	1.0%
0.14080 E - 07	0.36433 E - 10	0.25809 E - 11	0.36242 E - 10	-0.23903 E - 11	-6.6%

SFQ= 0.39110 E - 01

K1 = 0.38629 E + 12 K2= 0.16973 E + 07 N1= 0.25813 E - 11 N2= 0.15528 E - 08

N = 10

Gl 5.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.21320 E - 07	0.11416 E - 09	0.17841 E - 10	0.96659 E - 10	-0.34040 E - 12	-0.3%
0.36180 E - 07	0.17023 E - 09	0.17848 E - 10	0.15220 E - 09	0.17933 E - 12	0.1%
0.61950 E - 07	0.25279 E - 09	0.17851 E - 10	0.23165 E - 09	0.32908 E - 11	1.3%
0.18640 E - 06	0.45095 E - 09	0.17855 E - 10	0.45356 E - 09	-0.20464 E - 10	-4.5%
0.22600 E - 06	0.52219 E - 09	0.17855 E - 10	0.49419 E - 09	0.94223 E - 11	1.8%
0.26220 E - 06	0.55463 E - 09	0.17855 E - 10	0.52608 E - 09	0.10690 E - 10	1.9%

SFQ= 0.29358 E - 02

K1 = 0.56025 E + 11 K2= 0.58853 E + 07 N1= 0.17856 E - 10 N2= 0.86701 E - 09

N = 7

Gl 6.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.26100 E - 10	0.33790 E - 11	0.69960 E - 15	0.35615 E - 11	-0.18323 E - 12	-5.4%
0.45000 E - 10	0.56470 E - 11	0.69960 E - 15	0.58576 E - 11	-0.21755 E - 12	-3.9%
0.64000 E - 10	0.85980 E - 11	0.69961 E - 15	0.79619 E - 11	0.63545 E - 12	7.4%
0.84000 E - 10	0.10679 E - 10	0.69961 E - 15	0.99845 E - 11	0.69376 E - 12	6.5%
0.14400 E - 09	0.15389 E - 10	0.69961 E - 15	0.15099 E - 10	0.28927 E - 12	1.9%
0.20900 E - 09	0.18072 E - 10	0.69961 E - 15	0.19433 E - 10	-0.13620 E - 11	-7.5%
0.22900 E - 09	0.21522 E - 10	0.69961 E - 15	0.20576 E - 10	0.94520 E - 12	4.4%
0.32500 E - 09	0.24863 E - 10	0.69961 E - 15	0.25139 E - 10	-0.27719 E - 12	-1.1%

SFQ= 0.22197 E - 01

K1 = 0.14252 E + 16 K2= 0.27391 E + 10 N1= 0.69962 E - 15 N2= 0.53379 E - 10

N = 9

Gl 7.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.10260 E - 09	0.94127 E - 12	0.17718 E - 15	0.97579 E - 12	-0.34659 E - 13	-3.7%
0.28750 E - 09	0.25543 E - 11	0.17718 E - 15	0.25346 E - 11	0.19554 E - 13	0.8%
0.45600 E - 09	0.41432 E - 11	0.17718 E - 15	0.37691 E - 11	0.37388 E - 12	9.0%
0.69000 E - 09	0.50282 E - 11	0.17718 E - 15	0.52484 E - 11	-0.22039 E - 12	-4.4%
0.91500 E - 09	0.62349 E - 11	0.17718 E - 15	0.64641 E - 11	-0.22938 E - 12	-3.7%
0.82200 E - 09	0.61947 E - 11	0.17718 E - 15	0.59832 E - 11	0.21127 E - 12	3.4%

SFQ= 0.13998 E - 01

K1 = 0.56279 E + 16 K2= 0.44568 E + 09 N1= 0.17718 E -15 N2= 0.22315 E -10

N = 7

Gl 9.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.82800 E - 10	0.11000 E - 11	0.84260 E - 12	0.24402 E - 12	0.13377 E - 13	1.2%
0.50260 E - 09	0.22001 E - 11	0.84980 E - 12	0.14811 E - 11	-0.13079 E - 12	-5.9%
0.92710 E - 09	0.39308 E - 11	0.85046 E - 12	0.27318 E - 11	0.34858 E - 12	8.9%
0.15230 E - 08	0.50735 E - 11	0.85076 E - 12	0.44870 E - 11	-0.26427 E - 12	-5.2%
0.19380 E - 08	0.67330 E - 11	0.85086 E - 12	0.57091 E - 11	0.17302 E - 12	2.6%

SFQ= 0.14919 E - 01

K1 = 0.11781 E + 13 K2= 0.23112 E + 06 N1= 0.85124 E - 12 N2= 0.12752 E - 07

N = 6

Gl 12.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14400 E - 10	0.12449 E - 11	0.52769 E - 15	0.12259 E - 11	0.18469 E - 13	1.5%
0.26100 E - 10	0.21573 E - 11	0.52770 E - 15	0.22146 E - 11	-0.57874 E - 13	-2.7%
0.58800 E - 10	0.48989 E - 11	0.52771 E - 15	0.49439 E - 11	-0.45527 E - 12	-0.9%
0.76300 E - 10	0.65169 E - 11	0.52771 E - 15	0.63842 E - 11	0.13218 E - 12	2.0%
0.10200 E - 09	0.86742 E - 11	0.52771 E - 15	0.84742 E - 11	0.19944 E - 12	2.3%
0.13400 E - 09	0.10831 E - 10	0.52771 E - 15	0.11036 E - 10	-0.20520 E - 12	-1.9%

SFQ= 0.23251 E - 02

K1 = 0.18894 E + 16 K2= 0.28303 E + 09 N1= 0.52771 E - 15 N2= 0.30202 E - 09

N = 7

VV 1.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14013 E - 08	0.10730 E - 10	0.85196 E - 11	0.24095 E - 11	-0.19910 E - 12	-1.9%
0.30066 E - 08	0.14494 E - 10	0.85473 E - 11	0.51693 E - 11	0.77733 E - 12	5.4%
0.42475 E - 08	0.18447 E - 10	0.85544 E - 11	0.73025 E - 11	0.25901 E - 11	14.0%
0.57770 E - 08	0.17132 E - 10	0.85590 E - 11	0.99314 E - 11	-0.13546 E - 11	-7.9%
0.68466 E - 08	0.16756 E - 10	0.85610 E - 11	0.11770 E - 10	-0.35746 E - 11	-21.3%
0.82500 E - 08	0.22883 E - 10	0.85628 E - 11	0.14181 E - 10	0.13883 E - 12	0.6%
0.84973 E - 08	0.27298 E - 10	0.85630 E - 11	0.14606 E - 10	0.41286 E - 11	15.1%
0.11647 E - 07	0.29653 E - 10	0.85654 E - 11	0.20018 E - 10	0.10697 E - 11	3.6%
0.12399 E - 07	0.30592 E - 10	0.85657 E - 11	0.21310 E - 10	0.71655 E - 12	2.3%

SFQ= 0.99495 E - 01

K1 = 0.11690 E + 12 K2= 0.41258 E + 05 N1= 0.85716 E - 01 N2= 0.41677 E - 07

N = 10

VV 2.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.22390 E - 09	0.44354 E - 11	0.27496 E - 14	0.42997 E - 11	0.13295 E - 12	3.0%
0.16520 E - 09	0.34253 E - 11	0.27496 E - 14	0.34939 E - 11	-0.71305 E - 13	-2.1%
0.41460 E - 09	0.59849 E - 11	0.27496 E - 14	0.61299 E - 11	-0.14770 E - 12	-2.5%
0.64710 E - 09	0.77666 E - 11	0.27497 E - 14	0.74714 E - 11	0.29245 E - 12	3.8%
0.92740 E - 09	0.83563 E - 11	0.27497 E - 14	0.84706 E - 11	-0.11701 E - 12	-1.4%
0.10703 E - 08	0.92597 E - 11	0.27497 E - 14	0.88347 E - 11	0.42223 E - 12	4.6%
0.12106 E - 08	0.95232 E - 11	0.27497 E - 14	0.91299 E - 11	0.39051 E - 12	4.1%
0.13360 E - 08	0.90025 E - 11	0.27497 E - 14	0.93537 E - 11	-0.35400 E - 12	-3.9%
0.10396 E - 08	0.83940 E - 11	0.27497 E - 14	0.87625 E - 11	-0.37127 E - 12	-4.4%

SFQ= 0.10818 E - 01

K1 = 0.36261 E + 15 K2= 0.24144 E + 10 N1= 0.27497 E - 14 N2= 0.12254 E - 10

N = 10

VV 3.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.14900 E - 09	0.23054 E - 11	0.19975 E - 14	0.24820 E - 11	-0.17858 E - 12	-7.7%
0.30590 E - 09	0.50593 E - 11	0.19975 E - 14	0.43026 E - 11	0.75468 E - 12	14.9%
0.48660 E - 09	0.55448 E - 11	0.19975 E - 14	0.58040 E - 11	-0.26124 E - 12	-4.7%
0.62400 E - 09	0.68868 E - 11	0.19975 E - 14	0.66719 E - 11	0.21292 E - 12	3.1%
0.83060 E - 09	0.83467 E - 11	0.19975 E - 14	0.76840 E - 11	0.66072 E - 12	7.9%
0.10639 E - 08	0.77829 E - 11	0.19975 E - 14	0.85422 E - 11	-0.76132 E - 12	-9.8%
0.12296 E - 08	0.88389 E - 11	0.19975 E - 14	0.90259 E - 11	-0.18900 E - 12	-2.1%
0.13276 E - 08	0.96088 E - 11	0.19975 E - 14	0.92748 E - 11	0.33200 E - 12	3.5%

SFQ= 0.48913 E - 01

K1 = 0.49916 E + 15 K2= 0.14238 E + 10 N1= 0.19975 E - 14 N2= 0.14182 E - 10

N = 9

VV 4.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.38590 E - 10	0.44892 E - 11	0.19061 E - 14	0.44055 E - 11	0.81822 E - 13	1.8%
0.41060 E - 10	0.43976 E - 11	0.19061 E - 14	0.46604 E - 11	-0.26468 E - 12	-6.0%
0.66000 E - 10	0.60434 E - 11	0.19061 E - 14	0.70783 E - 11	-0.10368 E - 11	-17.2%
0.62590 E - 10	0.65408 E - 11	0.19061 E - 14	0.67635 E - 11	-0.22463 E - 12	-3.4%
0.73300 E - 10	0.89763 E - 11	0.19061 E - 14	0.77364 E - 11	0.12380 E - 11	13.8%
0.79100 E - 10	0.87537 E - 11	0.19061 E - 14	0.82445 E - 11	0.50724 E - 12	5.8%

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.93100 E - 10	0.98850 E - 11	0.19061 E - 14	0.94205 E - 11	0.46256 E - 12	4.7%
0.11560 E - 09	0.13240 E - 10	0.19061 E - 14	0.11173 E - 10	0.20650 E - 11	15.6%
0.22300 E - 09	0.15994 E - 10	0.19062 E - 14	0.17756 E - 10	-0.17640 E - 11	-11.0%
0.20300 E - 09	0.18164 E - 10	0.19061 E - 14	0.16712 E - 10	0.14502 E - 11	8.0%
0.39270 E - 09	0.24036 E - 10	0.19062 E - 14	0.24459 E - 10	-0.42473 E - 12	-1.8%

SFQ= 0.10231 E + 00

K1 = 0.52308 E + 15 K2= 0.25870 E + 10 N1= 0.19062 E - 14 N2= 0.48535 E - 10

N = 12

VV 9.DAT

Frei	Gebunden	1. Bindung	2. Bindung	Differenz	Proz.Abw.
0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.00000 E + 00	0.0%
0.26100 E - 10	0.33790 E - 11	0.87995 E - 15	0.35622 E - 11	-0.18410 E - 12	-5.4%
0.45000 E - 10	0.56407 E - 11	0.87996 E - 15	0.58585 E - 11	-0.21870 E - 12	-3.9%
0.64000 E - 10	0.85980 E - 11	0.87996 E - 15	0.79630 E - 11	0.63416 E - 12	7.4%
0.84000 E - 10	0.10679 E - 10	0.87997 E - 15	0.99857 E - 11	0.69244 E - 12	6.5%
0.14400 E - 09	0.15389 E - 10	0.87997 E - 15	0.15100 E - 10	0.28832 E - 12	1.9%
0.20900 E - 09	0.18072 E - 10	0.87997 E - 15	0.19433 E - 10	-0.13621 E - 11	-7.5%
0.22900 E - 09	0.21522 E - 10	0.87997 E - 15	0.20576 E - 10	0.94535 E - 12	4.4%
0.32500 E - 09	0.24863 E - 10	0.87997 E - 15	0.25138 E - 10	-0.27555 E - 12	-1.1%

SFQ= 0.22200 E - 01

K1 = 0.11331 E + 16 K2= 0.27409 E + 10 N1= 0.87998 E - 15 N2= 0.53357 E - 10

N = 9

16.5. RECHENPROGRAMME

```
FORTRAN IV      V02.1-10   Mon 19-May-80 06:44:36                    PAGE 001

0001            PROGRAM SINEIN
0002            REAL*4 A(2,20),P(3,3),STEP(3),M,FILNAM(3)
0003            DATA FILNAM/3*'     '/
0004            COMMON /NAM/A,M,I
0005            EXTERNAL SFQ
0006            WRITE(7,10)
0007  10        FORMAT(' ALTE DATEI ? ( JA=1, NEIN = 0 )')
0008            I=1
0009            READ(5,20) IN
0010  20        FORMAT(I1)
0011            WRITE(7,30)
0012  30        FORMAT(' WELCHER DATEINAME ? ')
0013            READ(5,32) FILNAM
0014  32        FORMAT(3A4)
0015            CALL ASSIGN(1,FILNAM)
0016            IF(IN.EQ.1) GO TO 60
0018            WRITE(7,35)
0019  35        FORMAT('$PROTEINKONZENTRATION = ')
0020            READ(7,36) PROKON
0021  36        FORMAT(F5.2)
0022            WRITE(1,36) PROKON
0023            WRITE(7,40)
0024  40        FORMAT(' EINGABE DER WERTEPAARE IN FORMAT 2E13.5')
0025  45        READ(5,50,END=70) (A(L,I),L=1,2)
0026            A(1,I)=A(1,I)*1.E12
0027            A(2,I)=A(2,I)*1.E12/PROKON
0028            WRITE(1,50) (A(L,I),L=1,2)
0029            I=I+1
0030  50        FORMAT(2E14.5)
0031            GO TO 45
0032  60        READ(1,36) PROKON
0033  65        READ(1,50,END=70) (A(L,I),L=1,2)
0034            I=I+1
0035            GO TO 65
0036  70        I=I-1
      C         WRITE(7,75)
      C75       FORMAT('$M = ')
      C         READ(5,50) M
0037            WRITE(7,80)
0038  80        FORMAT(' ANFANGSWERTE FUER'/'$K1 = ')
0039            READ(5,50) P(1,1)
0040            WRITE(7,100)
0041  100       FORMAT('$N1',' = ')
0042  110       READ(5,50) P(2,1)
0043            WRITE(6,125) FILNAM
0044            P(1,1)=P(1,1)*1.E-12
0045  127       P(2,1)=P(2,1)*1.E+12
0046            DO 120 L=1,2
0047  120       STEP(L)=P(L,1)/1.1
0048            CALL SIMPLX(F,P,3,3,STEP,0.500,1.E-20,SFQ,IER)
0049  125       FORMAT(1X,3A4//)
0050            WRITE(6,136)
0051  136       FORMAT(12X,'FREI',8X,'GEBUNDEN',6X,'   BINDUNG',
                1 3X,'PROZ. ABW.'/)
```

```
FORTRAN IV      V02.1-10   Mon 19-May-80 06:44:36                PAGE 002

0052          DO 140 L=1,I
0053          B1=A(1,L)*P(1,1)*P(2,1)/(1.+A(1,L)*P(1,1))*1.E-12
0054          DIF=A(2,L)*1.E-12-B1
0055          PRO=DIF/A(2,L)*100.*1.E12
0056   140    WRITE(6,150) A(1,L)*1.E-12,A(2,L)*1.E-12,B1,PRO
0057   150    FORMAT(3(3X,E13.5),3X,F5.1,' %')
0058          P(1,1)=P(1,1)*1.E12
0059   135    P(2,1)=P(2,1)*1.E-12
0060          WRITE(6,130) F,(P(L,1),L=1,2),I
0061   130    FORMAT(//' SFQ = ',E13.5//' K1 = ',E13.5,'  N1 = ',E13.5,
              1 /' N =',I3)
0062          STOP
0063          END
```

```
FORTRAN IV      V02.1-10   Mon 19-May-80 06:45:28                PAGE 001

0001          FUNCTION SFQ(P,MAX,I)
0002          REAL*4 A(2,20),M,P(MAX,MAX)
0003          COMMON /NAM/A,M,N
0004          SFQ=0
0005          DO 10 L=1,N
0006   10     SFQ=SFQ+((A(2,L)-A(1,L)*P(1,I)*P(2,I)/(1.+A(1,L)*P(1,I))
              1 )/A(2,L))**2
0007          RETURN
0008          END
```

```
FORTRAN IV      V02.1-10   Mon 19-May-80 06:42:31          PAGE 001

0001            PROGRAM SIMPRO
0002            REAL*4 A(2,20),P(5,5),STEP(4),M,FILNAM(3)
0003            DATA FILNAM/3*'     '/
0004            COMMON /NAM/A,M,I
0005            EXTERNAL SFQ
0006            WRITE(7,10)
0007  10        FORMAT(' ALTE DATEI ? ( JA=1, NEIN = 0 )')
0008            I=1
0009            READ(5,20) IN
0010  20        FORMAT(I1)
0011            WRITE(7,30)
0012  30        FORMAT(' WELCHER DATEINAME ? ')
0013            READ(5,32) FILNAM
0014  32        FORMAT(3A4)
0015            CALL ASSIGN(1,FILNAM)
0016            IF(IN.EQ.1) GO TO 60
0018            WRITE(7,35)
0019  35        FORMAT('$PROTEINKONZENTRATION = ')
0020            READ(7,36) PROKON
0021  36        FORMAT(F5.2)
0022            WRITE(1,36) PROKON
0023            WRITE(7,40)
0024  40        FORMAT(' EINGABE DER WERTEPAARE IM FORMAT 2E13.5')
0025  45        READ(5,50,END=70) (A(L,I),L=1,2)
0026            A(1,I)=A(1,I)*1.E12
0027            A(2,I)=A(2,I)*1.E12/PROKON
0028            WRITE(1,50) (A(L,I),L=1,2)
0029            I=I+1
0030  50        FORMAT(2E14.5)
0031            GO TO 45
0032  60        READ(1,36) PROKON
0033  65        READ(1,50,END=70) (A(L,I),L=1,2)
0034            I=I+1
0035            GO TO 65
0036  70        I=I-1
      C         WRITE(7,75)
      C75       FORMAT('$M = ')
      C         READ(5,50) M
0037            WRITE(7,80)
0038  80        FORMAT(' ANFANGSWERTE FUER'/'$K1 = ')
0039            READ(5,50) P(1,1)
0040            WRITE(7,90)
0041  90        FORMAT('$K2 = ')
0042            READ(5,50) P(2,1)
0043            DO 110 L=1,2
0044            WRITE(7,100) L
0045  100       FORMAT('$N',I1,' = ')
0046  110       READ(5,50) P(2+L,1)
0047            WRITE(6,125) FILNAM
0048            WRITE(6,126) (P(L,1),L=1,4)
0049  126       FORMAT(' K1 = ',E13.5,'  K2 = ',E13.5,
                1 '   N1 = ',E13.5,'   N2 = ',E13.5/)
0050            DO 127 L=1,2
0051            P(L,1)=P(L,1)*1.E-12
```

```
FORTRAN IV      V02.1-10   Mon 19-May-80 06:42:31                PAGE 002

0052  127   P(L+2,1)=P(L+2,1)*1.E+12
0053        DO 120 L=1,4
0054  120   STEP(L)=P(L,1)/1.1
0055        CALL SIMPLX(F,P,5,5,STEP,0,500,10,1.E-20,SFQ,ICR)
0056  125   FORMAT(1X,3A4//)
0057        CALL ASSIGN(2,'PLOT.DAT')
0058        WRITE(2,128)
0059  128   FORMAT('PUNKT')
0060        WRITE(6,136)
0061  136   FORMAT(12X,'FREI',8X,'GEBUNDEN',6X,'1. BINDUNG',
     1 6X,'2. BINDUNG',7X,'DIFFERENZ',3X,'PROZ. ABW.'//)
0062        DO 140 L=1,I
0063        B1=A(1,L)*P(1,1)*P(3,1)/(1.+A(1,L)*P(1,1))*1.E-12
0064        B2= A(1,L)*P(2,1)*P(4,1)/(1.+A(1,L)*P(2,1))*1.E-12
0065        DIF=A(2,L)*1.E-12-B1-B2
0066        PRO=DIF/A(2,L)*100.*1.E12
0067        WRITE(2,137) A(1,L)*1.E-3,A(2,L)
0068  137   FORMAT(2E15.5)
0069  140   WRITE(6,150) A(1,L)*1.E-12,A(2,L)*1.E-12,B1,B2,DIF,PRO
0070  150   FORMAT(5(3X,E13.5),3X,F5.1,' %')
0071        WRITE(2,170)
0072        DO  160 L=1,I
0073        B1=A(1,L)*P(1,1)*P(3,1)/(1.+A(1,L)*P(1,1))
0074  160   WRITE(2,137) A(1,L)*1.E-3,B1
0075  170   FORMAT('PLOT')
0076        WRITE(2,170)
0077        DO 180 L=1,I
0078        B2= A(1,L)*P(2,1)*P(4,1)/(1.+A(1,L)*P(2,1))
0079  180   WRITE(2,137) A(1,L)*1.E-3,B2
0080        WRITE(2,170)
0081        DO 190 L=1,I
0082        B1=A(1,L)*P(1,1)*P(3,1)/(1.+A(1,L)*P(1,1))
0083        B2= A(1,L)*P(2,1)*P(4,1)/(1.+A(1,L)*P(2,1))
0084  190   WRITE(2,137) A(1,L)*1.E-3,(B1+B2)
0085        ENDFILE 2
0086        DO 135 L=1,2
0087        P(L,1)=P(L,1)*1.E12
0088  135   P(L+2,1)=P(L+2,1)*1.E-12
0089        WRITE(6,130) F,(P(L,1),L=1,4),I
0090  130   FORMAT(//' SFQ = ',E13.5//' K1 = ',E13.5,'  K2 = ',E13.5,
     1 '   N1 = ',E13.5,'   N2 = ',E13.5//' N =',I3)
0091        STOP
0092        END

FORTRAN IV      V02.1-10   Mon 19-May-80 06:43:37                PAGE 001

0001        FUNCTION SFQ(P,MAX,I)
0002        REAL*4 A(2,20),M,P(MAX,MAX)
0003        COMMON /NAN/A,M,N
0004        SFQ=0.
0005        DO 10 L=1,I
0006  10    SFQ=SFQ+((A(1,L)*P(1,I)*P(3,I)/(1.+A(1,L)*P(1,I))
     1 -A(1,L)*P(2,I)*P(4,I)/(1.+A(1,L)*P(2,I)))/A(2,L))**2
0007        RETURN
0008        END
```

```
      PROGRAM SCATCH
      REAL*4 A(2,20),P(3,3),STEP(3),M,FILNAM(3)
      DATA FILNAM/3*'    '/
      COMMON /NAM/A,M,I
      EXTERNAL SFQ
      WRITE(7,10)
10    FORMAT(' ALTE DATEI ? ( JA=1, NEIN = 0 )')
      I=1
      READ(5,20) IN
20    FORMAT(I1)
      WRITE(7,30)
30    FORMAT(' WELCHER DATEINAME ? ')
      READ(5,32) FILNAM
32    FORMAT(3A4)
      CALL ASSIGN(1,FILNAM)
      IF(IN.EQ.1) GO TO 60
      WRITE(7,35)
35    FORMAT('$PROTEINKONZENTRATION = ')
      READ(7,36) PROKON
36    FORMAT(F5.2)
      WRITE(1,36) PROKON
      WRITE(7,40)
40    FORMAT(' EINGABE DER WERTEPAARE IM FORMAT 2E13.5')
45    READ(5,50,END=70) (A(L,I),L=1,2)
      A(1,I)=A(1,I)*1.E12
      A(2,I)=A(2,I)*1.E12/PROKON
      WRITE(1,50) (A(L,I),L=1,2)
      I=I+1
50    FORMAT(2E14.5)
      GO TO 45
60    READ(1,36) PROKON
65    READ(1,50,END=70) (A(L,I),L=1,2)
      I=I+1
      GO TO 65
70    I=I-1
C     WRITE(7,75)
C75   FORMAT('$M = ')
C     READ(5,50) M
      WRITE(7,80)
80    FORMAT(' ANFANGSWERTE FUER'/'$K1 = ')
      READ(5,50) P(1,1)
      WRITE(7,100)
100   FORMAT('$N1',' = ')
110   READ(5,50) P(2,1)
      WRITE(6,125) FILNAM
      P(1,1)=P(1,1)*1.E-12
127   P(2,1)=P(2,1)*1.E+12
      DO 120 L=1,2

120   STEP(L)=0.
      CALL SIMPLX(F,2,3,3,STEP,20,1.E-20,SFQ,IER)
125   FORMAT(1X,3A4//)
      WRITE(6,136)
136   FORMAT(12X,'FRE1',8X,'GEBUNDEN',6X,'   BINDUNG',
     1 3X,'PROZ. ABW.'/)
      DO 140 L=1,I
      B1=A(1,L)*P(1,1)*P(2,1)/(1.+A(1,L)*P(1,1)*1.E-12)
      DIF=A(2,L)*1.E-12-B1
      PRO=DIF/A(2,L)*100.*1.E12
140   WRITE(6,150) A(1,L)*1.E-12,A(2,L)*1.E-12,DIF,PRO
150   FORMAT(3(3X,E13.5),3X,F5.1,' %')
      P(1,1)=P(1,1)*1.E12
135   P(2,1)=P(2,1)*1.E-12
```

```
      WRITE(6,130) F,(P(L,1),L=1,2),I
130   FORMAT(//' SFQ = ',E13.5//' K1 = ',E13.5,'  N1 = ',E13.5,
     1 /' N =',I3)
      STOP
      END
      FUNCTION SFQ(P,MAX,I)
      REAL*4 A(2,20),M,P(MAX,MAX)
      COMMON /NAM/A,M,N
      SFQ=0
      DO 10 L=1,N
10    SFQ=SFQ+((A(2,L)-A(1,L)*P(1,I)*P(2,I)/(1.+A(1,L)*P(1,I))
     1 )/A(2,L))**2
      RETURN
      END
```

17. LITERATURVERZEICHNIS

1) *K.Lübke*, *E.Schilliner* und *M.Töpert*, Angew.Chem. 23, 790 (1976).
2) *P.Ehrlich*, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 42, 17 (1909).
3) *E.V.Jensen* und *H.I.Jacobsen*, Recent Prog.Horm.Res. 18, 387 (1962).
4) *B.W.Malley*, *M.R.Sherman* und *D.Toft*, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 67, 501 (1970).
5) *D.Toft* und *B.W.O'Malley*, J.Biol.Chem. 245, 6085 (1970).
6) *W.I.P.Mainwaring*, J.Endocrinol. 45, 531 (1969).
7) *L.Chan* und *B.W.O'Malley*, N.Engl.J.Med. 294, 1322, 1372, 1430 (1976).
8) *J.-P.Raynaud*, *M.-M.Bouton*. *D.Gallet-Bourquin*, *D.Philibert*, *C. Tournemine* und *G.Azadian-Boulanger*, Mol.Pharmacol. 9, 520-533 (1973).
9) *D.Toft* und *J.A.Gorski*, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 55, 1574 (1966).
10) *E.-E.Baulieu*, C.R.Acad.Sci., Paris, Ser. D. 265, 354-357 (1967).
11) *J.Anderson*, Biochem.J. 126, 561-567 (1972).
12) *E.J.Ariens*, Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. 99, 32 (1954).
13) *E.J.Ariens*,*J.M. van Rossum* und *A.M.Simonis*, Arzneim.*Forsch. 6, 282 (1956).
14) *A.C.Notides*, Endocrinology 87, 987-992 (1970).
15) *E.-E.Baulieu*, Nouv.Rec.Fr.Hematol. 7, 589-599 (1967).
16) *E.-E.Baulieu*, Ann.Endocrinol., Paris, Suppl. 29, 131-139 (1967).
17) *E.V.Jensen*, Science 182, 126-134 (1973).
18) *J.H.Clark*, *W.Klee*, *A.Levitzki* und *J.Wolf*, "Hormone and Antihormone Action at the Target Cell", Dahlem Konferenzen, Berlin 1976, S. 53.
19) *R.J.King* und *B.J.Gordon*, Endocrinology 34, 431 (1966).
20) *W.E.Stumpf*, Endocrinology 83, 777 (1968).
21) *J.H.Clark*, Nature 251, 446 (1974).
22) *C.Geynet*, *C.Millet*, *H.Truong* und *E.-E.Baulieu*, Estrogens and antiestrogens, Gynec.Invest. 3, 2-29 (1972).
23) *J.P.Raynaud*, *C.Bonne*, *M.M.Bouton*, *M.Moguilewski*, *D.Philibert* und *C.Azadian-Boulanger*, J.Steroid Biochem. 6, 615-622 (1975).

24) *H.Rochefort* und *F.Lignon*, Eur.J.Biochem. 48, 503-512 (1974).

25) *J.Gorski*, *D.Toft*, *G.Shyamala*, *D.Smith* und *A.Notides*, Recent Prog. Horm. Res. 24, 52 (1968).

26) *R.Glass*, *J.Loring*, *J.Spencer* und *C.Villee*, Endocrinology 68, 327-333 (1961).

27) *M.Hospital*, *B.Busetta*, *C.Courseille* und *G.Precigoux*, J.Steroid Biochem. 6, 221-225 (1975).

28) *M.Hospital*, *B.Busetta*, *R.Courseille*, *H.Weintraub* und *E.-E. Baulieu*, Mol.Pharmacol. 8, 438-445 (1972).

29) *J.T.Edsall* und *J.Wyman*, Biophysical Chemistry, Vol.1, Academic Press Inc., New York, 1958, S. 591.

30) *R.M.Rosenberg* und *I.M.Klotz*, Analytical Methods of Protein Chemistry, Vol.2, Pergamon Press, Oxford - London - New York - Paris, 1960, S. 131.

31) *W.Scholtan*, Makromol.Chem. 11, 131 (1951).

32) *G.Scatchard*, Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660 (1949).

33) *O.H.Lowry*, *N.J.Rosebrough*, *A.L.Farr* und *R.J.Randall*, J.Biol. Chem. 193, 265 (1951).

34) *W.Scholtan*, 1.Mitteil.: Makromol.Chem. 54, 24 (1962).

35) *P.Freychet*, Diabete Metabol. 1, 57 (1975).

36) *E.Schillinger*, *G.Prior*, *B.Samuelsson* und *R.Paoletti*, Advances in Prostaglandin and Thrombaxane Research, Raven Press, New York 1976, Bd. 1, S. 259.

37) *H.J.G.Hollemans* und *R.M.Bertina*, Clin.Chem. 21, 1769 (1975).

38) *S.I.Taylor*, Biochemistry 14, 2357 (1975).

39) *E.-E.Baulieu* und *J.-P.Raynaud*, Eur.J.Biochem. 13, 293-304 (1970).

40) *W.Scholtan*, Pharmakokinetik und Arzneimitteldosierung, Kolloquium, Borstel 1962. Antibiotica et Chemotherapia, Fortschr. 12, 103-110 (1964).

41) *J.P.Raynaud*, *Ch.Mercier-Bodard* und *E.-E.Baulieu*, Steroids 18, 769-770 (1971).

42) *E.-E.Baulieu*, *J.P.Raynaud* und *E.Milgram*, Karolinska Symposia on Research Methods in REproductive Endocrinology, 2nd Symposium, Steroid by Protein Binding 1970, S. 110, 111.

43) *E.Milgram* und *E.-E.Baulieu*, Biochim.Biophys.Acta 194, 602 (1969).

44) *M.Truong* und *E.-E.Baulieu*, Biochim.Biophys.Acta 237, 167-172 (1971).

45) *H.Rochefort* und *F.Capony*, FEBS Lett. 20, 11 (1972).
46) *S.G.Korenman*, Steroids 132, 163-176 (1969).
47) *R.L.Sutherland* und *E.-E.Baulieu*, Eur.J.Biochem. 70, 531-541 (1976).
48) *W.Scholtan*, 2.Mitteil.: Arzneim.-Forsch. 11, 707 (1961).
49) *W.Scholtan* und *J.Schmid*, Arzneim.-Forsch. 12, 711-750 (1962).
50) *W.Scholtan*, 3.Mitteil.; Arzneim.-Forsch. 14, 348, 349 (1964).
51) *W.Scholtan*, *K.Schloßmann* und *H.Rosenkranz*, Arzneim.-Forsch. 7, 767 (1968).
52) *R.A.Phelps* und *F.W.Putnam*, The Plasma Proteins, Academic Press, New York 1960, S. 143.
53) *Th.Peters*, Adv.Clin.Chem. 13, 37 (1970).
54) *L.O.Andersson*, *A.Rehnström* und *D.L.Eaker*, Eur.J.Biochem. 20, 371 (1971).
55) *F.Karush*, J.Am.Chem.Soc. 72, 2705 (1950).
56) *U.Westphal*, "Mechanism of Action of Steroid Hormones", Pergamon Press 1961, S. 33-83.
57) *D.Rodbard*, *W.Bridson* und *P.L.Rayford*, J.Lab.Clin.Med. 74, 771 (1969).
58) *E.V.Jensen*, *T.Suzuki*, *T.Kawashima*, *W.E.Stumpf*, *P.W.Jungblut* und *E.R.De Sombre*, Biochemistry 59, 632-637 (1968).
59) *A.C.Notides*, *D.E.Hamilton* und *J.H.Rudolph*, Biochim.Biophys. Acta 271, 214-224 (1972).
60) *G.Giannopoulos* und *J.Gorski*, J.Biol.Chem. 246, 2524-2529 (1971).
61) *G.A.Puce*, *E.Nola*, *V.Sica* und *F.Bresciani*, Biochemistry 10, 3769-3780 (1971).
62) *H.Truong*, *C.Geynet*, *C.Millet*, *O.Soulignac*, *R.Bucourt*, *M.Vignau*, *V.Torelli* und *E.-E.Baulieu*, FEBS Lett. 35, 289-293 (1973).
63) *H.E.Rosenthal*, Anal.Biochem. 20, 525 (1967).
64) *J.M.Wood*, *J.A.Bacon*, *A.W.Meibdum*, *W.H.Throckmorten* und *G.P. Turner*, J.Am.Chem.Soc. 63, 1334 (1941).
65) *K.Sisido* und *H.Nozaki*, J.Am.Chem.Soc. 70, 776 (1948).
66) *M.Maienthal*, *W.R.Benson*, *E.B.Sheinin* und *Th.D.Doyle*, J.Org. Chem. 43, 972 (1978).

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. J. Roth im September 1976 begonnen und im Mai 1980 zu Ende geführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. J. Roth, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, die er durch wertvolle Hinweise und großzügige Unterstützung stets gefördert hat.

Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Bonn, danke ich dafür, daß ich seine Ultrazentrifuge benutzen durfte.

Herrn Prof. Dr. F. Müller, Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Rechners.

Herrn Prof. Dr. F. Vögtle, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, danke ich für die Unterstützung zur Durchführung der Synthesen der Vergleichssubstanzen 14-17.

Herrn Kaul, Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Bonn, danke ich für die Erstellung der Rechenprogramme.

Lebenslauf

22.11.1949	Geboren in Weißenburg/Bayern Vater: Johannes Glaubitz, Apotheker Mutter: Anneliese Glaubitz, geb. Binkert
1956 - 1960	Besuch der Volksschule in Weißenburg/Bayern
1960 - 1969	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Max-von-Laue-Gymnasiums in Koblenz/Rheinl.Pfalz
16.6.1969	Abitur am Max-von-Laue-Gymnasium in Koblenz
1969 - 1971	Apothekerpraktikant in der Einhorn-Apotheke in Weißenburg/Bayern
12.7.1971	Pharmazeutisches Vorexamen in Nürnberg
SS 1972 - WS 1972/73	Studium der Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
SS 1973 - WS 1975/76	Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
28.4.1975	Erster Prüfungsabschnitt des Pharmazeutischen Staatsexamens in Bonn
12.4.1976	Zweiter Prüfungsabschnitt des Pharmazeutischen Staatsexamens in Bonn
28.6.1976	Approbation als Apotheker

1.9.1976	Beginn der vorliegenden Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. J. Roth
1.4.1977	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft
1.10.1979	Anstellung als wissenschaftlicher Angestellter